

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関 国際事務局



(43) 国際公開日 2002 年1月17日 (17.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号 WO 02/04640 A1

(51) 国際特許分類": C12N 15/12, 1 21, C07K 14 705, 16 28, C12P 21 02, C12Q 16 8, A61K 38 00, 45 00, 48 00, A61P 1 00, 3 00, 9 00, 25 28, 29 00, 35 00, 37 00, G01N 33 15, 33 50, 33 53, 33 566 (C12N 1 21, C12R 1,19) (C12P 21 02, C12R 1,19)

(21) 国際出願番号:

PCT JP01 05878

(22) 国際出願日:

2001年7月6日(06.07.2001)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2000-211989 2000年7月7日(07,07,2000) JP 特願2000-383794

2000年12月18日(18.12.2000) JP

(71) 出願人/米国を除く全ての指定国について/: 武田薬品工業株式会社(TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES、

LTD.) [JP JP]: 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP)

- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 /米国についてのみ/: 守谷岳郎 (MORIYA, Takeo) [JP JP]: 〒562-0001 大阪府箕面市箕面8丁目12-6 Osaka (JP). 伊藤隆司 (ITO, Takashi) [JP JP]: 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ704号 [baraki (JP). 新谷 靖(SHINTANI, Yasushi) [JP JP]: 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ703号 [baraki (JP). 宮嶋伸行 (MIYAJIMA, Nobuyuki) [JP JP]: 〒305-0031 茨城県つくば市吾妻4丁目16-4 プレビュー吾妻403 [baraki (JP).
- (74) 代理人: 小林純子、外(KOBAYASHI, Sumiko et al.): 〒104-0028 東京都中央区八重洲2丁目8番7号 福岡ビル9階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 /国内/: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FL GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

/続葉有/

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

(57) Abstract: A human-origin protein or its salt: a DNA encoding this protein: a method of determining a ligand to this protein: a screening method a screening kit for a compound capable of alterning the binding properties of the ligand to the protein: a compound obtained by the screening or its salt, etc. The above-described human-origin protein and the DNA encoding the same are usable in: (1) determining a ligand to the protein: (2) preventives and or remedies for diseases in association with the dysfunction of the protein: (3) screening a compound (an agonist, an antagonist, etc.) capable of alterning the binding properties of the ligand to the protein, etc.

(57) 要約:

本発明は、ヒト由来の蛋白質またはその塩、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法/スクリーニング用キット、該スクリーニングで得られる化合物またはその塩などを提供する。本発明のヒト由来の蛋白質またはそれをコードするDNAは、(1)本発明の蛋白質に対するリガンドの決定、(2)本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(3)本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニングなどに用いることができる。



ID 41, IN, 18, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LL 11, 13, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SL SK, SL, TJ, TM, TR, TT, 17, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH. GM. KE. LS. MW. MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM. (AE, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FL FR, GB, GR, IE, IT, のガイダンスノート」を参照。

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPL特許 (BE, BJ, CE, CG, CL CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、 定期発行される AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語

明細書

新規G蛋白質共役型レセブター蛋白質およびそのDNA

技術分野

5 本発明は、ヒト精巣由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩 およびそれをコードするDNAに関する。

背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異 10 的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター 蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein (以下、 G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また、7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質(7TMR 15)と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えば、ホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にはG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

25 例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白

 20°

10

15

20

25

質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセフター蛋白質においてもサブタイプが存在するかとうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST)としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質(すなわち、リガンド)との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質(すなわち、リガンド)と同様なシケナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子(例えばcDNA)をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな生理活性物質(すなわち、リガンド)の探索、また、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストの探索に有用である。一方、生理的なリガンドが見出

されなくても、該レセプターの不活化実験(ノックアウト動物)から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンクゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガニト、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防ご治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内(またはある特定の臓器)への導入や、

10 該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防。治療薬や診断薬に応用することもできる。

15 本発明は、上記のように有用な新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供す るものである。すなわち、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部 分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペ プチドをコートするホリヌクレオチド (DNA、RNAおよびそれらの誘導体) を含有するポリヌクレオチド(DNA、RNAおよびそれらの誘導体)、該ポリ 20 ヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換 体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役 型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該G蛋白質共役型 レセプターに対するリガントの決定方法、リカンドと該G蛋白質共役型レセプタ $2\overline{5}$ 一蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)または その塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方 法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該G蛋白質共役 型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニス ト)またはその塩、およびリカントと読G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結

10

全性を変化させる化合物(アンタゴニスト、アゴニスト)もしくは該G蛋白質共 社型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる 医薬などを提供する。

発明の開示 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト精巣由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする c DNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1~第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらの c DNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1)配列番号:10で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、
- 15 (2) 配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列を有する上記(1)のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、
 - (3) 配列番号:1、配列番号:5、配列番号:7、配列番号:13または配列番号:15で表わされるアミノ酸配列である上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、
- 20 (4) 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまた はその塩、
 - (5) 上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
 - (6) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、
- 25 (7) 配列番号: 2、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 11、配列番号: 14または配列番号: 16で表される塩基配列を有する上記(4)記載のポリヌクレオチド、
 - (8)上記(5)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
 - (9)上記(8)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、

- (10) 上記(9) 記載の形質転換体を培養し、上記(1) 記載のG蛋白質共 役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(1) 記載のG蛋白 質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
- (11) 上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(45) 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
 - (12) 上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を 不活性化する中和抗体である上記(11) 記載の抗体、
 - (13) 上記(11) 記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (14)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(4 10)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、
 - (15) 上記 (14) 記載のG蛋白質共役型レセプターのリガンドを含有してなる医薬、
- (16)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしては上記(4 15)記載の部分ペプチトまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載の G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガントの決定方法、
 - (17)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリカンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 - (18)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(4)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、
- 25 (19) 上記(17) 記載のスクリーニング方法または上記(18) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1) 記載のG蛋白質 共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその 塩、
 - (20) 上記(17) 記載のスクリーニング方法または上記(18) 記載のス

15

クリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質 共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその 塩を含有してなる医薬、

- (21) 上記(5) 記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下 5 でハイブリダイスするポリヌクレオチド、
 - (22)上記(5)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、
 - (23) 上記 (5) 記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法、
 - (24)上記(11)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載の G蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法、
 - (25)上記(23)または上記(24)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断剤、
 - (26)上記(23)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (27)上記(24)記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜におけ 20 る上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物また はその塩のスクリーニング方法、
 - (28)上記(26)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩、
- 25 (29)上記(27)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜に おける上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物 またはその塩、
 - (30)上記(26)記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記
 - (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物また

はその塩を含有してなる医薬、

- (31) 上記 (27) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、
- (32) 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤である上記(20)、(30)または(31)記載の医薬、
 - (33)哺乳動物に対して、上記(17)記載のスクリーニング方法または上記(18)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記
- 10 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療方法、
 - (34)哺乳動物に対して、上記(26)のスクリーニング方法を用いて得られると記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療方法、
 - (35) 哺乳動物に対して、(27) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療方法、
 - (36) 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤を製造するための上記(17) 記載のスクリーニング方法または上記(18) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用、
 - (37) 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤を製造するための上記(26) 記載のスクリー

15

20

さらには、

5

10

- エング方法を用いて得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の使用、
- (38) 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤を製造するための上記(27) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の使用等に関する。
- (39) ヒト以外の哺乳動物に対して、上記(17) 記載のスクリーニング方法または上記(18) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することにより中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防方法又は、治療方法、
- (40) ヒト以外の哺乳動物に対して、上記(26) 記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防方法又は、治療方法、
- (41) ヒト以外の哺乳動物に対して、上記(27) 記載のスクリーニング方 20 法を用いて得られうる細胞膜における上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化台物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防方法又は、治療方法、
- (42) 蛋白質が、①配列番号:10で表わされるアミノ酸配列、配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:10で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列

、③配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、 $1\sim30$ 個程度、より好ましくは $1\sim10$ 個程度、さらに好ましくは数個($1\sim5$ 個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または①それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(43)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(4)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(16)記載のリガンドの決定方法、

(44)リガンドが、例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド 、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューコペプチド 10 Y、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、P ACAP27、PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、ア ドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、P TH、VIP (ハソアクティブ インテスティナル ポリペプチト)、ソマトス 15 タチン、ドーバミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシト ニンジーンリレーティッドヘプチト)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、 プロスタグランジン、トロンボキサン、アデフシン、アドレナリン、ケモカイン スーパーファミリー (例、1L-8, $GRO\alpha$, $GRO\beta$, $GRO\gamma$, NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SD 20 F-1などのCXCケモカインサブファミリー;MCAF/MCP-1,MCP -2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1a , MIP=1 β , HCC=1, MIP=3 α , LARC, MIP=3 β , ELC . I = 309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2. MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー 25 - ; lymphotactinなどのCケモカインサブファミリー : fracta 1kineなどのCN3Cケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エン テロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティック ボリペプタイト、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)またはスフィンゴ シン1-リン酸である上記(43)記載のリガントの決定方法、

15

- (45) (i) 上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(4) 記載の部分へプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(4) 記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上記(17) 記載のスクリーニング方法、
- (46) (i) 標識したりカントを上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(4) 記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(4) 記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリカンドの上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記(4) 記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (47) (i) 標識したリガンドを上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (48) (i) 標識したリガンドを上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンド および試験化合物を上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20

 $2\overline{5}$

- (49) (i) 標識したリガンドを上記(9) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(9) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (50) (1) 上記(1) 記載の母蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との塩との名の (1) 記載の母蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記(1) 記載の母蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(1) 記載の母蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、母蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリカンドと上記(1) 記載の母蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
 - (51)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(9)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、
 - 上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化 台物および試験化合物を上記 (9) 記載の形質転換体を培養することによって該 形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場 合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、 比較することを特徴とするリガントと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプタ 一蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニ ング方法、
 - (52) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、

パソプレッシン、オキシトシン、PACAP (例、PACAP 27, PACAP 38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマト スクチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクテ ィブ インテスティナル ポリペプチド)、ソマトスタチン、トーパミン、モチ リン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッド ヘプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロ ンホキサン、アデノシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、 1L-8, $GRO\alpha$, $GRO\beta$, $GRO\gamma$, NAP-2, ENA-78, GCP-2. PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCケモカ インサフファミリー; MCAF/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP 10 -4, eotaxin, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, HCC-1. MIP-3 α /LARC, MIP-3 β /ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケモカインサブファミリー; lymphotacti nなどのCケモカインサプファミリー;fractalkineなどのCX3C 15 ケモカインサプファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミ シ、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックボリベプタイド、ガラニン 、リゾホスファチジン酸(LPA)またはスフィンゴシン1-リン酸である上記 (50) または(51) 記載のスクリーニング方法、

20 (53)上記(45)~(52)記載のスクリーニング方法で得られうるリガントと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(54) 上記(45) ~上記(52) 記載のスクリーニング方法で得られうる リガンドと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との 結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(55)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記(18)記載のスクリーニング用キット、

(56)上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(18)記載のスクリーニング用キット

 20°

- (57) 上記(9) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の 細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする 上記(18) 記載のスクリーニング用キット、
- 5 (5.8) 上記 (5.5) ~ (5.7) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる。 リガンドと上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- (59) 上記(55) ~ (57) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られらる、リガントと上記(1) 記載のG蛋白質共役型レモプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、
 - (60) 上記 (11) 記載の抗体と、上記 (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (4) 記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記 (1) のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記 (4) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、
 - (61) 上記(11) 記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(4) 記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(4) 記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(4) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および
 - (62) 被検液と担体上に不溶化した上記(11) 記載の抗体および標識化された上記(11) 記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1) 記載の G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(4) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、
 - (63)上記(6)に記載のDNAを含有してなる遺伝子診断薬、
 - (64) 上記(6)のDNAが導入されることを特徴とするトランスジェニッ

ク動物、

- (65)上記(8)記載の組換えベクターにより上記(6)記載のDNAが動物に導入されることを特徴とする上記(64)記載のトランスジェニック動物、
- (66) トランスジェニック動物がヒト以外の哺乳動物である上記 (64) 記 載のトランスジェニック動物、
 - (67)上記(64)記載のトランスジェニック動物を用いることを特徴とする上記(6)記載のDNAの欠損・損傷に起因する疾病に対して効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (68) 上記(64) 記載のトランスジェニック動物を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、等を提供する。

図面の簡単な説明

- 図1は、TGR17-1の疎水性プロット図である。
- 図2は、TGR17-2の疎水性プロット図である。
- 15 図3は、TGR17-3の疎水性プロット図である。
 - 図4は、TGR17-4の疎水性プロット図である。
 - 図5は、一文字表記によるTGR17-1のアミノ酸配列を示す図である。
 - 図6は、一文字表記によるTGR17-2のアミノ酸配列を示す図である。
 - 図7は、一文字表記によるTGR17-3のアミノ酸配列を示す図である。
- 20 図8は、一文字表記によるTGR17-4のアミノ酸配列を示す図である。図9は、TGR17-5の疎水性プロット図である。
 - 図10は、TGR17-6の疎水性プロット図である。
 - 図11は、一文字表記によるTGR17-5のアミノ酸配列を示す図である
- 25 図12は、一文字表記によるTGR17-6のアミノ酸配列を示す図である
 - 図13は、実施例5で行われたTGR17-1 の発現組織分布の解析結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質(以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある)は、配列番号:10で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

5 ここで、配列番号:10で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質としては例えば配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質などが挙げられるが、かかる配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質としては、例えば配列番号:5で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号:7で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号:10で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号:13で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号:13で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号:15で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号:15で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号:15で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質が挙げられる。

15 本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、モルモット 、ラット、マウス、ウサギ、フタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、クリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム 細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維 細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナ チュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、 20 滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは 間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球 系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部 位(例、嗅球、扁頭核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮 25 質、延髓、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殼、尾状核、脳染、黒質)、脊髓 、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚 、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末 梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋な どに由来する蛋白質であってもよく、また台成蛋白質であってもよい。

20

配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましては約60%以上、より好ましては約70%以上、さらに好ましては約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましては約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号:10で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号:10で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号:10で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

10 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質としては、例えば配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号: 5で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号: 7で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号: 13で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質、配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質が挙げられる。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後に記載するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

25 また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号:10で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、 $1\sim30$ 個程度、より好ましくは $1\sim10$ 個程度、さらに好ましくは数個($1\sim5$ 個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:10で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、 $1\sim30$ 個程度、より好ましくは $1\sim10$ 個程度、さらに好まし

10

15

くは数個($1\sim5$ 個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:10で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、 $1\sim30$ 個程度、より好ましては $1\sim10$ 個程度、さらに好ましては数個($1\sim5$ 個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または30それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って、左端が N末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプター蛋白質は、C末端がカルボキシル基(-COOH)、カルボキシレート(-COOT)、アミド($-CONH_2$)またはエステル(-COOR)の何れであってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-プチルなどの C_{14} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロペキシルなどの C_{34} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha-$ ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニルーC、アルキル基もしくは $\alpha-$ ナフチルメチルなどの $\alpha-$ ナフチルー C_{14} アルキル基などの C_{54} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などか用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシ 20 レート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されて いるものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては 、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプター蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残態のアミノ基が保護基 (例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₅ アルカノイル基などのC₁₅アシル基など) で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 (例えば、-〇日、-S日、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など) が適当な保護基 (例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂₅アルカノイル基などのC₁₅アシル基など) で保護されているも

15

の、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる

本発明のレセフター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号:1、5、7、10、13または15で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド(以下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、上記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号:1、5、7、10、13または15で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

20 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質 25 の活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、 $1\sim10$ 個程度、さらに好ましくは数個($1\sim5$ 個))のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、 $1\sim20$ 個程度、より好ましくは $1\sim10$ 個程度、さらに好ましくは数個($1\sim5$ 個))

のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましては、 $1\sim10$ 個程度、より好ましては数個、さらに好ましては $1\sim5$ 個程度)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分パプチドはC、末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COOT)であるが、上記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド(-COOR)またはエステル(-COOR)であってもよい。

さらに、本発明の部分パプチトには、上記した本発明のレセブター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnかピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ヘンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、上記したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載する本発明のレセプター蛋白質をコートするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することかできる。また、後に記載する蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織ま 25 たは細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマ トグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み 合わせることにより精製単離することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。その

10

15

PCT/JP01/05878 WO 02/04640 20

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド、ハーエチルー類としては、DCC、N, N'ージイソプロピルカルボジイミド、Nーエチルース・(3ージメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これN'ー(3ージメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOOBt)とともらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、対称酸無水物またはHOBtに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対称酸無水物またはHOBtにステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化をエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を

20 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合 反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, レージメチルホルムアミド, N, Nージメチルアセトアミド, Nーメチルピロリ Nージメチルホルムアミド類、塩化メチレン, クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素 ドンなどの酸アミド類、塩化メチレン, クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素 ドンなどの酸アミド類、塩化メチレン, クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素 スルホキシド類、ピリジン, ジオキサン, テトラヒドロフランなどのエーテル類 スルホキシド類、ピリジン, ジオキサン, テトラヒドロフランなどのエーテル類 スルホキシド類、ピリジン, ジオキサン, デトラヒドロフランなどのエーテル類 スルホキシド類、ピリジン, ジオキサン, デトラヒドロフランなどのエーテル類 は蛋白質結合形成反応に使用されらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度 ルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度 ルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。 反応温度 は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択される。 活性化されたアミノ酸誘、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘

導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。エンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダソールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチル オキシカルボニル、イソホルニルオキシカルホニル、4-メトキシペンジルオキ シカルホニル、C1-Z、Br-Z、アタマンチルオキシカルホニル、トリフルオロ アセチル、フタロイル、ホルミル、2 ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニ ルホスフィノチオイル、Fmocなどか用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、 プロピル、プチル、ターシャリープチル、シクロペンチル、シクロペキシル、シ クロペプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしく は環状アルキルエステル化)、アラルキルエステル化(例えば、ベンシルエステ ル、4-ニトロペンジリエステル、4-メトキシペンジルエステル、4-クロロ ペンジルエステル、ペンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ペン ジルオキシカルボニルヒドラシド化、ターシャリープトキシカルボニルヒドラジ ド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ペン ゾイル基などのアロイル基、ペンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

25 チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bz1、 $C1_2$ -Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリープチルなどか用いられる。 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2

,3,6-トリメチルインゼンスルホニル、DNP、ペンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル(アルコール(例えば、ベンタクロロフェノール、2,4ージニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、Nーヒトロキシスクシミド、Nーヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル)などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの 触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンス ルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの 10 混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、 ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウム による還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃ ~40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェ ノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィ 15 ド、1、4-ブタンジチオール、1、2-エタンジチオールなどのようなカチオ ン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用 いられる2、4ージニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、ト リプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保 20 護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によ っても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護 基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から 適宜選択しうる。

25

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α – カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド (蛋白質) 鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α – アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去し

た蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。 縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を 精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得るこ とができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を 凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミト体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α - カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法 10 に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによっ て製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液 切合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分 ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場 合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知 の総合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①~⑤に記載された方法が 挙げられる。

IM Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis). Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New 20 York (1965年)

③ 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

①矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 蛋白質の化学IV、205、(19 77年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド台成 広川書店

25 また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチトを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

15

20

本発明のレセプター蛋白質をコードするボリヌクレオチドとしては、上記した本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列(DNAまたはRNA、好ましくはDNA)を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ボリヌクレオチトとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(すなわち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(すなわち、非コード鎖)であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、 10 公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれ に準じた方法により、本発明のレセプター蛋白質のmRNAを定量することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するハクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 2、6、8、11、14または16で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 2、6、8、11、14または16で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、

25 本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号: 2、6、8、11、14または16で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号: 2、6、8、11、14ま

たは1.6で表わされる塩基配列と約7.0%以上、好ましては約8.0%以上、より 好ましては約9.0%以上、最も好ましては約9.5%以上の相同性を有する塩基配 列を含有するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2 nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

10 該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプタ 15 一蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号:2で表わされる塩基配列を含 有するDNAなどが用いられる。

また、配列番号:5で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコートするDNAとしては、配列番号:6で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

20 配列番号:7で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号:8で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号:10で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコートするDNAとしては、配列番号:11で表わされる塩基配列を含有するDNAなどか用いられる。

配列番号:13で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコートするDNAとしては、配列番号:14で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

配列番号:15で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコー

ドするDNAとしては、配列番号:16で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分へプチトをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製または発現を **阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)を、クローン化** した、あるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA 10 の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド(核酸) は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズするこ とができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはG蛋 白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レ セプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型レ 15 セプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およ びG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズするこ とができるホリヌクレオチドは、生体内および生体外でG蛋白質共役型レセプタ 一蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療ま たは診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、 20 塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを 意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド(蛋白質)との間で「 対応する」とは、ヌクレオチド(核酸)の配列またはその相補体から誘導される 指令にあるペプチド(蛋白質)のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レ セプター蛋白質遺伝子の5、端へアピンループ、5、端6-ベースペア・リピー 25 ト、5′端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、OR F翻訳開始コドン、3、端非翻訳領域、3、端パリンドローム領域、および3、 端へアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセ プター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係

は、対象物とハイブリダイズすることができるボリヌクレオチドとの関係は、「 アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリマクレオチドは 、2~デオキシーD~リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D~ リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリンまたはビリミシニ塩 5 基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非スク レオチド骨格を有するその他のボリマー(例えば、市販の蛋白質核酸わよび台成 配列特異的な核酸ポリマー)または特殊な結合を含有するその他のホリマー(但 し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基 の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する)などが挙げられる。それ らは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDN 10 A:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチト(ま たは非修飾オリコヌクレオチト)、さらには公知の修飾の付加されたもの、例え ば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化された もの、1個以上の天然のヌクレオチトを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオ チト修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例えば、メチルホスホネート、ホス 15 ホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど)を持つもの、電荷を 有する結合または硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロシチオ エートなど)を持つもの、例えば蛋白質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒ ビター、トキシン、抗体、シグナルベプチト、ボリーレーリジンなど)や糖(例 えば、モノサッカライドなど)などの側鎖基を有しているもの、インターカレン 20 ト化合物(例えば、アクリジン、プソラレンなど)を持つもの、キレート化台物 (例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など)を含有する もの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば、αア ノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチ 25 下」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、 修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした 修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよ びピリミシン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたマ クレオチトおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、

10

15

例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、 あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド(核酸)は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸(RNA、DNA)である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチナホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計される。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8. pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結 合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与 されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることが できうる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を 20 中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を 高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質(例えば、ホスホリピド、コ レステロールなど)といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂 質としては、コレステロールやその誘導体(例えば、コレステリルクロロホルメ ート、コール酸など)が挙げられる。こうしたものは、核酸の3、端あるいは5 25 '端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着 させることができうる。その他の基としては、核酸の3、端あるいは5、端に特 異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌ クレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用 の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリ

コールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それ に限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチトをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチトをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、ハクテリオファージ、プラスミト、コスミト、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

10

15

20

25

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号:2、6、8、11、14または16で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2)配列番号:2、6、8、11、14または16で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号: 2、6、8、11、14または16で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号: 2、6、8、11、14または16で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手

15

段としては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloring)2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

10 DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan (登録商標) -super Express Km (宝酒造 (株))、Mutan (登録商標) -K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法やGapped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5、末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3、末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

20 本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、 (イ) 本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、 (ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13、pSL301)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、入ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pc

DNAI /NeoなEが用いられる。

本発明で用いられるフロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRaプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる

これらのうち、CMVプロモーター、SRaプロモーターなどを用いるのか好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、AP_Lプロモーター、1ppプロモーター などが、宿主がハチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

15 発現バクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシンクシ グナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、S V40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることかで きる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒトロ葉酸還元酵素(以下、dhfr と略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンビシ リン耐性遺伝子(以下、Ampiと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺 伝子(以下、Neoiと略称する場合がある。、ネオマイシン耐性遺 伝子(以下、Neoiと略称する場合がある。G418耐性)等が挙げられる。 特に、CHO(dhfr)細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして 使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白 質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、Pho A・シグ ナル配列、Omp A・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α ーアミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母 である場合は、M F α・シグナル配列、SUC 2・シグナル配列など、宿主か動 物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、αーインターフェロン・ อ

25

シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、 昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. US A), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Bio logy)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)], DH5α [Inoue, H., Noi ima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28(1990)], DH10B [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4645-4649(1990)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス(Bacillus subtilis 20) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cere visiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC 1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) などが 用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; S f 細胞)、Trichoplusia niの中

腸由来のMG 1 細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™ 細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; BmN細胞) などが用いられる。該S 子細胞としては、例えば、S f 9 細胞(ATCC (RL1711)、

5 Sf21細胞(以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217. (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) 、315巻,592(1985)〕。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero、チャイニーズハムス 9ー細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズ ハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr)細胞と略記)、マウス上細胞,マウスAtT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・15 ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・サ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことかできる

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラ
 ル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メッソス・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology),194巻、182-187(1991)、プロシージンクズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・

25 ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ/テクノロジー (Bi o/Technology), 6, 47–55 (1988)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコール、263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology)、52巻、456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有 する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ベプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

15 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地(ミラー(Miller),ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecu lar Genetics),431-433,Cold Spring Harbor Laboratory,New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、 3β -インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間 行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行な 25 い、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian, K. L. ら、「プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や

0.5%カザミノ酸を含有するSD培地(Bitter, G. A. ら、「ブロシージング ズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、81巻、5330(1984)〕が挙げられる。培地のpHは約 $5\sim8$ に調整するのが好ましい。培養は通常約 $20\%\sim35\%$ で約 $24\sim72$ 時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 1.0% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の 1.0% 日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むME M培地(サイエンス(Science), 1 2 2巻、5 () 1 (1 9 5 2)] , DME M培地(ヴィロロジー(Virology)、8巻、3 9 6 (1 9 5 9)] , RPM I 1 6 4 0 培地(ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association 1 9 9巻、5 1 9 (1 9 6 7)] , 1 9 9 培地(プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 7 3巻, 1 (1 9 5 0)] などが 用いられる。p H は約 6~8 であるのか好ましい。培養は通常約 3 0℃~4 0℃ で約 1 5~6 0 時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記 25 の方法により行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、 培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、 超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破 壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法など

20

25

が適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

5 このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDSーポリアクリルアミトゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の 方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得ら れた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他 の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な 蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを 部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、 キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコ シダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識した リガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどに より測定することができる。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分へプチドまたはその塩(以下、本発明のレセフター蛋白質等と略記する場合がある)に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

5 [モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアシュバントを投与してもよい。投与は通常2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好まして用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー(Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

25 骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2 \angle 0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は $1:1\sim20:1$ 程度であり、PEG(好ましくは、PEG1000 \sim PEG6000)が $10\sim80$ %程度の濃度で添加され、約 $20\sim40$ °C、好ましくは約 $30\sim37$ °Cで約 $1\sim10$ 分間インキュへ

10

15

20

25

ートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリトーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPM!1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地(和光純薬工業(株))またはハイブリトーマ培養用無血清培地(SFM-101、日水製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

「ポリクローナル抗体の作製」

1.0

15

20

25

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原(レセフター蛋白質等の抗原)とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮台剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルホジイミド、マレイミト活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮台生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは 担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全 フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投 与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のホリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ボリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分へプチドまたはその塩、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチトをコードするDNAは、(1)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリカンド(アゴニスト)の洗

ō

10

15

ことができる。

定、(2)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患 の予防および。または治療剤、(3)遺伝子診断剤、(4)本発明のレセプター 蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方 法、(5)本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化さ せる化合物を含有する各種疾病の予防および。または治療剤、(6) 本発明のG 蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリカンドの定量法、(7) 本発明のG蛋 白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニ スト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法、(8)本発明のG蛋白質共 役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、 アンタゴニスト)を含有する各種疾病の予防および「または治療剤、(9)本発 明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化さ せる化合物のスクリーニング方法、(11)細胞膜における本発明のレセプター 蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予 |防および|| または治療剤、(12) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分 ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和、(13)本発明のG蛋白質共役 型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いる

特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物(例、アゴニスト、アンタゴニストなど)をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

25 本発明のレセプター蛋白質もしくは部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記する場合がある)、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

(1) 本発明のG蛋白質共役型Lセプター蛋白質に対するリガンド(アゴニスト)の決定

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしく はその塩は、本発明のトセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド (アゴニスト)を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分へプチドもしてはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガントの決定方法を提供する。

試験化台物としては、公知のリガント(例えば、テンギオテンシン、ポンペシ 10 ン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、 ニューロベプチドY、オビオイト、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、P ACAP(例、PACAP27、PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、 カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、AC TH、GRP、PTH、VIP (パソアクティブ) インテスティナル アンド リレイテッド。ポリペプチト)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミ 15 リン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンシーンサレーティッドペプチト) 、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン 、アデフシン、アドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、IL-8、 GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF 20 4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1 abstraction CXC <math>b abstraction TDF-1 $r \in \mathbb{U}$ + : MCAF - MCP - 1. MCP - 2. MCP - 3. MCP - 4. $\epsilon \circ$ taxin, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, HCC-1, MIP -3α LARC, MIP-3 β , ELC, I-309, TARC, MIPF-1, MIPF-2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, S 25LCなどのCCケモカインサブファミリー; lymphotactinなどのC ケモカインサプファミリー:fractalkineなどのCX3Cケモカイン サブファミリー等)、エンドセリン、エンテロカストリン、ヒスタミン、ニュー ロテンシン、TRH、パンクトアティックボリベプタイド、ガラニン、リソホス ファチシン酸(LPA)、スフィンゴシン1-リン酸など)の他に、例えば、ヒ

トまたは哺乳動物(例えばマウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の 組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養 上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しなが ら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

5

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²+遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法である。

15 本発明のリガント決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその 部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質 または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定 することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- 20 ①標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本 発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化 合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する 結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対 するリガンドの決定方法、
- 25 ②標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含

有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセフター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

5 可試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における。レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca゚遊離、細胞内CAMP生成、細胞内CGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガントの決定方法を提供する。

15

25

20 特に、上記①~③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に 結合することを確認した後に、上記④~⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分パプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質が適している。

本発明のレセプター蛋白質を製造するには、上記の発現方法が用いられるが、 該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではな い。例えば、遺伝子断片や台成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus : NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献(Nambi、P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、267巻、19555~19559頁、1992年)に記載の方法に従って行うことができる。

10

15

25

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

20 本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehiem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)による破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500rpm~3000

rpm) で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~3000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。読膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり10%~10%分子であるのが好ましく、10%~10%分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガント結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

10 本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の① ~③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験 化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガント結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

15

標識した試験化合物としては、 [³H] 、 [¹²⁵I] 、 [¹⁰C] 、 [³⁵S] などで 標識したアンキオテンシン、ボンベシン、カナヒノイト、コレシストキニン、グ ルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチトY、オピオイド、プリン 、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、PACAP27、PACA 20 - P38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマ トスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(ハソアク ティブ インテスティナル アンド リイテット ポリベプチド) 、ソマトスタ チン、ドーパミン、モチリン、アミリン、プラジキニン、CGRP(カルシトニ ンシーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プ 25 ロスタグランジン、トロンボキサン、アディシン、アトレナリン、ケモカインス ーパーファミリー (例、IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2 , ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig. PBSF \angle SDF -1などの $C \times C$ ケモカインサブファミリー; $M C \times A F \times M C \cap P - 1$, $M \cap P - 1$ 2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, RANTES, MIP-1 α ,

10

15

20

25

M1P-1 β 、HCC-1、MIP-3 α /LARC、MIP-3 β /ELC、1-309、TARC、MIPF-1、MIPF-2/eotaxin-2、MDC、DC-CK1/PARC、SLCなどのCCケモカインサブファミリー;1ymphotactinなどのCケモカインサブファミリー;fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(LPA)、スフィンゴシン1ーリン酸などが好適である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定 方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の 膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を 調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バ ッファー、トリスー塩酸バッファーなどのリカンドとレセプター蛋白質との結合 を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減さ せる目的で、CHAPS、Tween-80™(花王-アトラス社)、ジギトニ ン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの 各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリ セプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ベプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することも できる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm ~5000000cpm)の $[^{8}H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識し た試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未 標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃~50℃、望 ましくは約4 \mathbb{C} ~37 \mathbb{C} で、約20分~24時間、望ましくは約30分~3時間 行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後 、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるい は γ - カウンターで計測する。全結合量 (B) から非特異的結合量 (NSB) を 引いたカウント (B-NSB) が0cpmを越える試験化合物を本発明のレセプ ター蛋白質またはその塩に対するリガンド (アゴニスト) として選択することが できる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の④ ~5の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例) えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Call遊離、細胞内cA MP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細 胞内蛋白質のリン酸化、clfosの活性化、pHの低下などを促進する活性ま たは抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定す ることができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチ ヴェルプレート等に培養する。リガント決定を行なうにあたっては前もって新鮮 な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物な 1() ごを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収 して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標と する物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によ って検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なっ てもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなど 15 で細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出 することかできる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガント決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガン下決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

20

- ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液
- 25 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 0.45μ mのフィルターで濾過減菌し、4 \mathbb{C} で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②) G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個 $^\circ$ 穴で継代し、37 $^\circ$ $^\circ$ $5 \% CO_2$ 、95 % air で 2 日間培養したもの

- ③標識試験化合物

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて 1μ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

10 ① 建非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~100倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

15

20

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CH 〇細胞を、測定用緩衝液1m1で2回洗浄した後、490μ1の測定用緩衝液を 各穴に加える。

②標識試験化合物を 5μ 1加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を 5μ 1加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、心臓、膵臓、脾臓、精巣などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP(例、PACAP27, PACAP38)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、P

TH、VIP(バソアクティブ インテスティナル アレド リレイテッド ボ リペプチド)、ソマトスタチン、ドーバミン、モチリン、アミリン、ブラジキニ ン、CGRP(カルミトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン 、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、ア ドレナリン、ケモカインスーパーファミリー(例、ILー8、GROα、GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, GCP-2, PF4, IP-10, Mig, PBSF/SDF-1などのCXCケモカインサブファミリー: MCA F/MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, cotaxin, RA NTES, MIP-1a, MIP-1B, HCC-1, MIP-3a, LARC 10 $MIP=3\beta$ ELC, I=309, TARC, MIPF=1, MIPF=2/eotaxin-2, MDC, DC-CK1/PARC, SLCなどのCCケ モカインサプファミリー:1ymphotactinなどのCケモカインサブフ ァミリー;fractalkineなどのCX3Cケモカインサブファミリー等)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TR 15 H、パンクレアティックボリペプタイド、ガラニン、リゾホスファチジン酸(L PA)、スフィンゴミン1ーリン酸などが用いられる。

(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の 予防および。または治療剤

上記 (1) の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明 20 らかになれば、該リカンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプター蛋白質 または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを、本発明のレセプター蛋白質 の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として使用す ることができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない(該レセプター蛋白質の欠乏症)患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、②(イ)本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植

することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、 リガンドの作用を充分に発揮させることができる。すなわち、本発明のレセプタ 一蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機 能不全に関連する疾患の予防およびごまたは治療剤として有用である。

10 本発明のレセプター蛋白質または該レセプター蛋白質をコードするDNAは中枢疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など)、炎症性疾患(例えば、アレルギー、喘息、リュウマチなど)、循環器疾患(例えば、高血圧症、心肥大、狭心症、動脈硬化症等)、癌(例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等)、糖尿病などの予防および15 または治療に有用である。

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

25 例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコ

10

15

20

25

一下するDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル 、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される 単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤におけ る有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ チン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨 化剤、ステアリン酸でグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ ンのような甘味剤、ベバーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物 は注射用水のようなベビクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産 出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他 の補助薬を含む等張液(例えば、Dーソルビトール、Dーマンニトール、塩化ナ トリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、 エタノール)、ボリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリ コール)、非イオン性界面活性剤(例、ボリソルマ、ート80世、HCO-50) などと併用してもよい。油性液としては、例えば、コマ油、大豆油などが用いら れ、溶解補助剤である安息香酸ペンジル、ベンジルアルコールなどと併用しても よい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、りン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ヘンサルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルプミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサキ、ヒツシ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

õ

10

15

20

25

本発明のレセプクー蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約 $0.1 mg \sim 100 mg$ 、好ましくは約 $1.0 \sim 50 mg$ 、より好ましくは約 $1.0 \sim 20 mg$ である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約 $0.01 \sim 30 mg$ 程度、好ましくは約 $0.1 \sim 20 mg$ 程度、より好ましくは約 $0.1 \sim 20 mg$ 程度、より好ましくは約 $0.1 \sim 20 mg$ 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当たりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~20mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(3)遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(ゲノミックス(Genomics), 第5

15

巻、 $874\sim879$ 頁(1989年)、フロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、第86巻、 $2766\sim2770$ 頁(1989年))などにより実施することができる。

(4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分パプチドの発現量を変化させ る化合物のスクリーニング方法

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、例えば、(i)非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii)形質転換体等に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチトのmRNA量を測定することによる、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分パプチドのmRNA量の測定は具体的には以下のようにして行なう。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサキ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓、膵臓、脾臓、精巣など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。
- 25 得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えば、TaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することかでき、自体公知の手段により/ザンプロットを行うことにより解析することもできる。
 - (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチトを発現する形質転

20

25

技体を上記の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋 目質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができ る。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合 物のスクリーニングは、

- (1) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前(30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前)もしくは一定時間後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~24時間後)、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後(30分後~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましくは1時間後~24時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後~34時間後)、細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ
- 15 (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化台物を培地中に混合させ、 一定時間培養後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましくは 2日後~3日後)、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはそ の部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵

生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の 化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のLセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

5 該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カブセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、フタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

- 15 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば、動脈硬化症患者(6 0 kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1 .0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによって20 も異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。
- 25 (5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させ る化合物を含有する各種疾病の予防および/または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、中枢機能、循環機能、消 化機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがっ て、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化

10

合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および 。または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ 15 チン、コーンスターチ、トラカント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨 化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ ンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物 20は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産 出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他 の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナ 25 トリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール (例、 エタノール)、ボリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリ コール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80™、HCO-50) などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いら れ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用しても

よしょ

25

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ホリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ヘンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配台してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

- 10 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのか好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。
- 20 (6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法 本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、 生体内におけるリカント濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競台法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガント濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

- ①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)
- ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

15

(7) 本発明のG蛋白質共役型トセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物 (例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、(イ)G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる(なお、上記(イ)の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい)。

すなわち、本発明は、(i) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプ 20 チドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と(ii) 本発明のレセプター 蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物と を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプ ター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合 物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

25 本発明のスクリーニング方法においては、(i)と(ii)の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標

15

20

識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場 台における、標識したリガン下の該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し 、比較することを特徴とするリガンドと本発明のしセプター蛋白質等との結合性 を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- ②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該 細胞の膜画分に接触させた場台と、標識したリガンドおよび試験化台物を本発明 のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合に おける、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比 較することを特徴とするリガントと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変 10 化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養すること によって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識した リカントおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養するこ とによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合に おける、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比 転することを特徴とするリカントと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変 化させる化台物またはその塩のスクリーニング方法、

(4)本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化台物(例えば、本発明のレセプ ター蛋白質等に対するリガンドなど)を本発明の1セプター蛋白質等を含有する 細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物およ び試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合に もける、レセプターを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチ ルコリン遊離、細胞内Ca゚゚遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、 イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fo 25 s の活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し 、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性 を変化させる化合物またはその塩のスクリーニンク方法、および

(5)本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物(例えば、本発明のレセプ) 夕一蛋白質等に対するリカントなど)を本発明のDNAを含有する形質転換体を

培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²¹遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタコニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て(一次スクリーニング)、その後に該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験(二次スクリーニング)が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

- 20 しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。
- 25 本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、上記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なこと

15

20

から、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のLセプター蛋白質等などが適している。

本発明のL セプター蛋白質等を製造するには、上記の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコートするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするパキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のボリハトリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチナネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR αプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献(Nambi、P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、267巻、19555~19559頁、1992年)に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒト、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質等 25 を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehiem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン

20

(Kinematica社製)のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~3000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、10 1細胞当たり10³~10⁸分子であるのが好ましく、10⁵~10⁷分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスク リーニングする上記の①~②を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋 白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば〔 3 H〕、〔 125 I〕、〔 14 C〕、〔 35 S〕などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる 化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含有 する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁する ことによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリスー塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでも

 20°

にい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80¹⁸(在王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッフ テーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセフターやリガンド ♂ 分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E−64 (ペプチド研究所製) 、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01m 1~10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~50000c $p(\mathbf{m})$ の標識したリガントを添加し、同時に $1.0^{\circ}\mathrm{M} \sim 1.0^{\circ\mathrm{M}}$ の試験化合物を 共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンド を加えた反応チューブも用意する。反応は約0 \mathbb{C} から $50\mathbb{C}$ 、望ましくは約4 \mathbb{C} 10 から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反 応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同パッファーで洗浄した後、ガラス繊 維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはアーカウン ターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B.) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント (B_b -NSB) を100%とした時、特異的結合 15 量(B-NSB)が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のあ る候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④~⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca ** 遊離、細胞内 c AMP生成、細胞内 c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成か、細胞が含有する分解酵素によっ

て検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

5 細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、上記の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化 10 合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、 これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

15

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アル 20 ブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径 $0.45 \mu \text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4 Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37 \mathbb{C} 、 $5% \mathbb{CO}_2$ 、95% air \mathbb{C} 2日間培養したもの

③標識リガンド

市販の〔 3 H〕、〔 125 I〕、〔 14 C〕、〔 35 S〕などで標識したリガンド 水溶液の状態のものを 4 C あるいは 2 O C にて保存し、用時に測定用緩衝液 にて1μMに希釈する。

④リガンド標準液

リガンドを0.1 %ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1 mMとなるように溶解し、-20 で保存する。

5 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CH 〇細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を 各穴に加える。

② $10^{-3}\sim10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を 5μ 1加えた後、標識リガントを 5μ 10 1加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを 5μ 1加えておく。

③反応液を除去し、1m1の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4m1の液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

15 ④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB)を次の式で求める。

 $PMB = [(B-NSB) / (B_0-NSB)] \times 100$

PMB: Percent Maximum Binding

B:検体を加えた時の値

20 NSB: Non-specific Binding (非特異的結合量)

B₀ :最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる 化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変 化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)G蛋白質共役型レセプ ターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、 細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、p 日の低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を

石しない化合物(いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増 強する化合物、あるいは(二)リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋 白質との結合力を減少させる化合物である。

5 該化台物としては、ヘプチド、蛋白、非ペプチト性化合物、合成化合物、発酵 生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の 化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター 蛋白質等に対するリカンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リカンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化 15 合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強 するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる 化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減 少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 20 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる 化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って 実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する 医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無 菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。
- 25 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者(60)

20

25

kgとして)においては、一日につき約 $0.1\sim100\,\mathrm{mg}$ 、好ましくは約 $1.0\sim50\,\mathrm{mg}$ 、より好ましくは約 $1.0\sim20\,\mathrm{mg}$ である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者($60\,\mathrm{kg}$ として)においては、一日につき約 $0.01\sim30\,\mathrm{mg}$ 程度、好ましくは約 $0.1\sim20\,\mathrm{mg}$ 程度、より好ましくは約 $0.1\sim20\,\mathrm{mg}$ 程度を静脈注射により投与するのが好都台である。他の動物の場合も、 $60\,\mathrm{kg}$ 当たりに換算した量を投与することができる。

(8) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化 10 させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニスト) を含有する各種疾病の予防および アまたは治療剤

本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば中枢機能、循環機能、消化機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガントとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニスト)や本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドは、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

該化合物やリガンドを本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の 予防および、または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化する ことができる。

例えば、該化合物やリガンドは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラ

10

15

20

チン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨 化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ ンのような甘味剤、ベパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤な どが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料に さらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物 は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産 出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他 の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルピトール、D-マンニトール、塩化ナ トリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、 エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリ コール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80™、HCO−50) などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いら れ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用しても よい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

さらに、上記予防・治療剤は適当な薬剤と組み合わせて例えば本発明のレセプター蛋白質が高発現している臓器や組織を特異的なターゲットとしたDDS製剤として使用することもできる。

25 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者(60)

kgとして)においては、一日につき約 $0.1\sim100\,\mathrm{mg}$ 、好ましくは約 $1.0\sim50\,\mathrm{mg}$ 、より好ましくは約 $1.0\sim20\,\mathrm{mg}$ である。非経口的に投与する場合は、その $1\,\mathrm{mg}$ 投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者($60\,\mathrm{kg}$ として)においては、一日につき約 $0.01\sim30\,\mathrm{mg}$ 程度、好ましくは約 $0.1\sim20\,\mathrm{mg}$ 程度、より好ましくは約 $0.1\sim20\,\mathrm{mg}$ 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、 $60\,\mathrm{kg}$ 当たりに換算した量を投与することができる。

(9) 本発明のレセプター蛋白質もしてはその部分ペプチドまたはその塩の定 10 量

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫 測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

- (i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に 15 反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを 特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、
 - (ii) 被検液と担体上に下溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の 抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を 測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提 供する。
 - 上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体(以下、本発明のモ フクローナル抗体と称する場合がある)を用いて本発明のレセプター蛋白質等の 測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目 的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')。、F ab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対 する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗

15

20

25

原量(例えば、レセプター蛋白質量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原 複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む 標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法 を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法および サンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサン ドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔¹⁵⁵ I〕、〔³³ I〕、〔³⁴ I)、〔¹⁴ C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、βーガラクトシダーゼ、βーグルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチンーアビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、 蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方 法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースな どの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂 、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を 反応させ(1次反応)、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応さ せ(2次反応)た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液 中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。1次反応と2次反応 は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なっ てもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用 抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させ

15

 20°

25

る等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセフター蛋白質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好まして用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましてはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、 競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる 。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させた のち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B,Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する 。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をボリエチレングリ コール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体とし て固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体と して固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗 体に対して競合反応させた後間相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗 原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗 体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識 量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については

、総説、成書などを参照することができる(例えば、人江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、人江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモノジー(Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D:Selected Immunoassays))

10 、 同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques (Part E:Monoclonal Antibodies a nd General Immunoassay Methods))、 同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques (Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照)。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白 15 質またはその塩を感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する 各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

(10)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの 25 量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたは その塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセプタ 一蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用 いることができる。

15

20

すなわち本発明は、例えば、

- (i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしては細胞等を破壊した後、細胞膜画分を重離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
- (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしてはその部分ペプチドを発現する形質転換件等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、
- (jii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチトの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。
- (iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチトの定量は具体的には以下のようにして行なう。

(i)正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサキ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど)に対して、薬剤(例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など)あるいは物理的ストレス(例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など)などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器(例えば、脳、肝臓、腎臓、脾臓、精巣など

)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液(例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など)等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤(例えば、トリトンX100 M。ツイーン 20 Mなど)などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。

細胞膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)のよる破砕、超音波による破砕、フレンチプレスなどで加圧しなから細胞を細いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破砕液を低速(500rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~3000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を順画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分か多く含まれる。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、 例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

- 20 かかるサンドイッチ免疫測定法は上記の方法と同様にして行なうことができ、 ウエスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。
 - (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を上記の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。
- 25 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化 させる化合物のスクリーニングは、
 - (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前(30分前~24時間前、好ましくは30分前~12時間前、より好ましくは1時間前~6時間前)もしくは一定時間後(30

予議~3日後、好ましくは1時間後~2日後、より好ましては1時間後~24時間後)、または薬剤あらいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与 経一定時間経過後(30分後~3日後、好ましては1時間後~2日後、より好ま しくは1時間後~24時間後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質また はその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができ。

- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後(1日後~7日後、好ましくは1日後~3日後、より好ましくは2日後~3日後)、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチトの量を定量することにより行なうことができる。
- 10 細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。
- (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど) に対して、薬剤 (例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など) あるいは物理的ストレス (例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など) などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器 (例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓、膵臓、脾臓、精巣など)、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。細胞表層での誘受容体蛋白質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該蛋白質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。
- (iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転25 換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、G蛋白質共役型

15

レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Cali遊離、細胞内 CAMP生成、細胞内 CGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、Cofosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を増強させる化合物、(ロ)細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、蛋白、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵 生産物などが挙げられ、これら化台物は新規な化合物であってもよいし、公知の 化合物であってもよい。

10 該細胞刺激活性を増強させる化台物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化台物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳 20 動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.

 $0\sim50\,\mathrm{mg}$ 、より好ましくは約1. $0\sim20\,\mathrm{mg}$ である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者($60\,\mathrm{kg}$ として)においては、一日につき約 $0.01\sim30\,\mathrm{mg}$ 程度、好ましくは約 $0.1\sim20\,\mathrm{mg}$ 程度、より好ましくは約 $0.1\sim10\,\mathrm{mg}$ 程度を静脈注射により投与す

20

25

るのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

- (11) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防およびどまたは治療剤
- 5 本発明のレセプター蛋白質は上記のとおり、例えば、中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。したがって、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および。または治療剤として用いることができる。
- 10 該化台物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および ノまたは治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができ る。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラヒアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、セラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ベパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方するこ

20

25

とができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブトウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、Dーソルビトール、Dーマンニトール、塩化ナトリウムなど)などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ボリソルベート80[™]、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸 10 ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ペンザルコニウム、塩酸プロカイ ンなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ボリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤など と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳 15 動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サ ルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.

 $0\sim50\,\mathrm{mg}$ 、より好ましくは約1. $0\sim20\,\mathrm{mg}$ である。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、動脈硬化症患者(60kgとして)においては、一日につき約0. $01\sim30\,\mathrm{mg}$ 程度、好ましくは約0. $1\sim20\,\mathrm{mg}$ 程度、より好ましくは約0. $1\sim10\,\mathrm{mg}$ 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(12) 本発明のレセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体による中和

本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗

15

 20°

25

体の、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、すなわち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、 該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキトン酸遊雕、アセチルコリン遊離、細胞内C a 当遊離、細胞内c AMP生成、細胞内 C GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、 c ー f o s の活性化、 p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を不活性化することができる。したがって、 該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患の予防および「または治療に用いることができる。

10 (13) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有す る動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック動物を作製することができる。動物としては、哺乳動物 (例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、プタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) など (以下、動物と略記する場合がある) か挙げられるが、特に、マウス、ウサキなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビギアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および 体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞 において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫か全て อิ

15

20

25

その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現さ 10 せられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアン タゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のレセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければし体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸

c D N A : 相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : +=:

G: 57=3

C : 5 F 5 C

RNA : リホ核酸

5 mRNA : メッセンジャーリボ核酸

dATP : デオキシアデノシン三リン酸

dTTP: デオキシチミジン三リン酸

dGTP: :デオキシグアノシン三リン酸

d C T P : ナオキシシ チジン 三リン酸

10 ATP : アテノシン三リン酸

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

SDS : トテシル硫酸ナトリウム

Gly : グリシン

Ala : アラニン

15 Val :バリン

Leu :ロイシン

Ile :イソロイシン

Ser :セリン

Thr :スレオニン

20 Cys : システイン

Met:メチオニン

Glu : グルタミン酸

Asp: :アスパラキン酸

Lys : USC

25 Arg : アルキニン

His :ヒスチジン

Phe :フェニルアラニン

Tyr : チロシン

Trp:: トリプトファン

Pro

:プロリン

Asn

: アスパラギン

Gln

: グルクミン

pGlu :ピロクルタミン酸

5 * :終止コトンに対応する

Ме

:メチル基

 \mathbf{E} t

:エチル基

Вu

: ブチル基

Ρh

:フェニル基

10 ТС : チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記 する。

 $T \circ s$

: p - トルエンスルフォニル

CHO

: ホルミル

15

Bz1

:ペンジル

C1, Bz1

: 2, 6ージクロロベンジル

Bom

: ベンジルオキシメチル

Z

: ベンジルオキシカルボニル

C1-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル

20

Br-Z : 2-プロモベンジルオキシカルボニル

Вос

: t ープトキシカルボニル

DNP

: ジニトロフェノール

Trt

: トリチル

Bum

: t ープトキシメチル

25

Fmoc: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル

HOBt : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

1.2.3-ベンゾトリアジン

HONB

:1-ヒドロキシー5-ノルボルネン-2.3-ジカルボキシイミド

DCC : N, N' ージシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号:1

5 本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-1のアミノ酸配列を示す。

配列番号:2

配列番号: 1 で示されるヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質T G R 1 7 - 1 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

10 配列番号: 3

以下の実施例1、4および5におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩 基配列を示す。

配列番号: 4

以下の実施例1、2、3、4および5におけるPCR反応で使用したプライマ 15 --- 2の塩基配列を示す。

配列番号:5

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-2のアミノ酸配列を示す。

配列番号:6

20 配列番号:5で示されるヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-2をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号:7

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-3のアミノ酸配列を示す。

25 配列番号:8

配列番号:7で示されるヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR 17-3をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号:9

以下の実施例2におけるPCR反応で使用したプライマー3の塩基配列を示す

配列番号:10

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質 T G R 1 7 - 4 のアミノ酸配列を示す。

5 配列番号:11

配列番号: 10 で示されるヒト由来新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 TG R 17-4 をコードする c D N A の塩基配列を示す。

配列番号:12

以下の実施例3におけるPCR反応で使用したプライマー4の塩基配列を示す 10。

配列番号:13

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-5のアミノ酸配列を示す。

配列番号: 14

15 配列番号:13で示されるヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-5をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号:15

本発明のヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-6のアミノ酸配列を示す。

20 配列番号:16

配列番号:15で示されるヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質TGR17-6をコードするcDNAの塩基配列を示す。

配列番号:17

以下の実施例 5 における P C R 反応で使用したフォワードプライマーTGR17T 25 QFの塩基配列を示す。

配列番号:18

以下の実施例 5 における P C R 反応で使用したリバースプライマーTGR17TQR の塩基配列を示す。

配列番号:19

以下の実施例5におけるPCR反応で使用したプローブTGR17TQPの塩基配列を示す。

配列番号:20

以下の実施例 1 及び 4 における P C R 反応で使用したプライマー 5 の塩基配 5 列を示す。

配列番号: 21

20

以下の実施例1及び4におけるPCR反応で使用したプライマー6の塩基配列を示す。

以下の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli 10) TOP10/pSL301-TGR17-1は、2000年 (平成12年) 12月7日から茨城県つ 点は市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法 人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命 工学工業技術研究所:NIBH) に寄託番号FERM BP-7385として、 2000年 (平成12年) 11月28日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-1 15 7-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄 託番号IFO 16505として寄託されている。

以下の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pCR2.1-TGR17-2は、2000年 (平成12年) 12月7日から茨城県つビば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所:NIBH) に寄託番号FERM BP-7386として、2000年 (平成12年) 11月28日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16506として寄託されている。

2000年(平成12年) 11月28日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所(IFO) に寄託番号IFO 16507として寄託されている。

以下の実施例3で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli 5) TOP10/pCR2. 1-TGR17-4は、2000年 (平成12年) 12月7日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所:NIBH) に寄託番号FERM BP-7388として、2000年 (平成12年) 11月28日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-1 7-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16508として寄託されている。

以下の実施例4で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pSL301-TGR17-5は、2000年 (平成12年) 12月7日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所: NIBH) に寄託番号FERM BP-7389として、2000年 (平成12年) 11月28日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16509として寄託されている。

以下の実施例4で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pSL301-TGR17-6は、2000年 (平成12年) 12月7日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (旧 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所: NIBH) に寄託番号FERM BP-7390として、25 2000年 (平成12年) 11月28日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-1

2000年(平成12年) 11月28日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 (郵便番号532-8686) の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16510として寄託されている。

15

20

25

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例1 ヒト精巣由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト精巣cDNA(CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(配列番号: 3)およびプライマー2(配列番号: 4)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを3 μ 1鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1μ 1量、プライマー1(配列番号: 3)およびプライマー2(配列番号: 4)を各 0.5μ M、dNTPsを 200μ M、および酵素に添付のバッファーを 10μ 1、GC Meltを 5μ 1加え、 50μ 1の液量とした。PCR反応は、95℃・1分の後、<math>95℃・30秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・30秒、66℃・300秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・300中、500中、500中、500中、500中、500中、500中でで500中で500中でで500中でで500中でで500中でで500中ででで500中ででで500中ででで500中でで500中でで500中でで500中ででで500中ででで500中ででで500中ででで500中ででで500中ででで500中ででで500中ででで500中ででで500中ででで500中でで500中ででで500中ででで500中でで500中でで500中でで500中でで500中で500

さらに、TGR17-1をpCR2.1にクローニングして作製したプラスミド(pCR2.1-TGR1 7-1) $1\mu1$ を鋳型としてAdvantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) $1\mu1$ 量、プライマー5(配列番号:20)およびプライマー6(配列番号:21)を各0.5 μ M、dNTPsを200 μ M、および酵素に添付のバッファーを $10\mu1$ 、GC Meltを $5\mu1$ 加え、50 $\mu1$ の液量とし、PCR反応を行った。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・30秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・300秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・300秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・300秒、68℃・300秒、68℃・300秒、68℃・300秒、68℃・300秒、68℃・300秒、68℃・3000回繰り返し最後に68℃・3000回長反応を行った。得られたPCR反応物をQIAquick PCR Purification Kitely IQIAGEN(Germany)]にて精製し、制限酵素Sal IおよびSpe Iにより全長C

プター蛋白質をTGR17-1と命名した。

DNA断片を切り出した後、プラスミドベクターpSL301 (Invitrogen社) のSal I、Spe I siteに該遺伝子断片を組み込み、プラスミドベクターpSL301-TGR17-1を作製した。その形質転換体をエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pSL301-TGR17-1と命名した。

5

10

15

20

25

実施例2 ヒト精巣由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト精巣cDNA(CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー3(配列 番号:9) およびプライマー2 (配列番号:4) を用いてPCR反応を行った。該反応 における反応液の組成は上記cDNAを3μ1鋳型として使用し、Advantage-GC2 Poly merase Mix (CLONTECH社) 1μ1量、プライマー3 (配列番号:9) およびプライ マー2(配列番号:4)を各0.5μM、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッフ アーを 10μ l、GC Meltを 5μ l加え、 50μ lの液量とした。PCR反応は、95°・1分 の後、95℃・30秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・30秒、66℃・30秒、68℃ ・2分のサイクルを5回、95℃・30秒、64℃・30秒、68℃・2分のサイクルを30回 繰り返し最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTOPO-TAクロー ニングキット (Invitrogen社) の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1 (Invitr ogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つク ローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を 解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする2種のcDNA配 列(配列番号:6および配列番号:8)を得た。これらのアミノ酸配列を含有する 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をTGR17-2およびTGR17-3と命名した。 さらに、それらの形質転換体をそれぞれエシェリヒア コリ (Escherichia coli) T OP10/pCR2. 1-TGR17-2、エシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pCR2. 1-TGR 17-3と命名した。

実施例3 ヒト精巣由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト精巣cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー4(配列

番号:12) およびプライマー2 (配列番号:4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを 3μ 1鋳型として使用し、Advantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1μ 1量、プライマー4 (配列番号:12) およびプライマー2 (配列番号:4) を各 0.5μ M、dNTPsを 200μ M、および酵素に添付のバッ

- 5 ファーを10 μ 1、GC MeItを5 μ 1 加え、50 μ 1 の液量とした。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・30秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・30秒、66℃・30秒、68℃・2分のサイクルを30 で・2 分のサイクルを5回、95℃・30秒、64℃・30秒、68℃・2分のサイクルを30 回繰り返し最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTOPO-TAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1(Invi
- 10 trogen社) ハサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つ クローンをアンビシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列 を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号: II) を得た。これらのアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レ セプター蛋白質をTGR17-4と命名した。
- 15 さらに、その形質転換体をエシェリヒア コリ(Escherichia coli) TOP10/pCR2. I-TGR17-4と命名した。

TGR17-1、TGR17-2、TGR17-3およびTGR17-4の疎水性プロット図をそれぞれ図1、図2、図3および図4に示す。

20 実施例4 ヒト精巣由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト精巣cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (配列番号:3) およびプライマー2 (配列番号:4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAを3μ1鋳型として使用し、Advantage-GC2 P olymerase Mix (CLONTECH社) 1μ1量、プライマー1 (配列番号:3) およびプライマー2 (配列番号:4) を各0.5μM、dNTPsを200μM、および酵素に添付のバッファーを10μ1、GC Meltを5μ1加え、50μ1の液量とした。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・30秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・30秒、66℃・30秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・30秒、68℃・2分のサイクルを30

10

15

20

25

回繰り返し最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応産物をTOPO-TAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌TOP10に導入し、cDNAを持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする2種のcDNAの塩基配列(配列番号:14および配列番号:16)を得た。これらのアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をTGR 1.7-5 およびTGR 1.7-6 とそれぞれ命名した。

さらに、TGR17-5およびTGR17-6をpCR2. 1にクローニングして作製したプラスミド (pCR2. 1-TGR17-5およびpCR2. 1-TGR17-6) $1\mu1$ を鋳型としてAdvantage-GC2 Polymerase Mix (CLONTECH社) $1\mu1$ 量、プライマー5 (配列番号20) およびプライマー6 (配列番号21) を各 0.5μ M、dNTPsを 200μ M、および酵素に添付のNッファーを $10\mu1$ 、GC Meltを $5\mu1$ 加え、 $50\mu1$ の液量とし、PCR反応を行った。<math>PCR反応は、<math>95℃・1分の後、95℃・30秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・300秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・300秒、68℃・2分のサイクルを5回、95℃・300秒、68℃・2分のサイクルを50回繰り返し最後に68℃・7分の伸長反応を行った。 得られたPCR反応物をQIAquick PCR Purification Kit [QIAGEN (Germany)] にて精製し、制限酵素Sal IおよびSpe Iにより全長<math>cDNA断片を切り出した後、プラスミドベクターpSL301 (Invitrogen社) のSal I、Spe I siteに該遺伝子断片を組み込み、プラスミトベクターpSL301-TGR17-5およびpSL301-TGR17-6を作製した。それらの形質転換体をそれぞれエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10/pSL301-TGR17-6と命名した。

TGR17-5およびTGR17-6の疎水性プロット図をそれぞれ図9および図10に示す。

実施例5 TagMan PCRを用いたTGR17の発現組織分布の解析

プライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PEバイオシステムズジャパン) を用いてデザインし、フォワードプライマー TGR17TQF (5'—T CTGC TACTG ACCTA CTTGA CTTT GG— 3'(配列番号:17))、リバースプライマー

TGR17TQR (5' =ACTGAGGTCTGCCGTTTTCCAG= 3' (配列番号:18)) 、フローブTGR17TQP (5' =TCCTG GTCAT TGTCT TCCC CTTCA GTAA CA= 3' (配列番号:19)) を作製した。プローブのリボーター色素はFAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

5 スタンダード cDNA は、 pCR2. 1-TGR17-1を鋳型にしてプライマー 1 (配列番号:3)、プライマー 2 (配列番号:4)を用いて増幅したPCR断片を QIAquick PC R Purification Kit [QIAGEN (Germany) ! にて精製し、 10° - 10° コピー / 5ヵ1 に調製して用いた。

各組織の cDNAソースはCLONTECH社SMART RACE Library Systemを用いて作製した各種cDNA libraryを用いた。TGR17-1発現量と同時に、TaqMan β-actin control reagents Mix (PEバイオシステムズジャパン)を用いてβ-actin発現量を測定してnormalizeすることにより、TGR17-1の組織分布を比較した。

TaqMan PCRは、TaqMan Universal PCR Master Mix (PEバイオシステムズジャパン) の試薬を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PEバイオシステムズジャパン) にて、添付の説明書に従い反応させた。

結果を図13に示す。これより、TGR17は精巣および脳に高い発現が見られた

産業上の利用可能性

15

20 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチト (例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体) は、①リガンド (アゴニスト)の決定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

請求の範囲

- 1. 配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
- 5 2. 配列番号:10で表わされるアミノ酸配列を有する請求項1記載のG蛋白質 共役型レセプター蛋白質またはその塩。
 - 3. 配列番号: 1、配列番号: 5、配列番号: 7、配列番号: 13または配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列である請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
- 10 4. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその 塩。
 - 5. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
 - 6. DNAである請求項5記載のポリヌクレオチド。
- 15 7.配列番号: 2、配列番号: 6、配列番号: 8、配列番号: 1 1、配列番号: 1 4または配列番号: 1 6で表される塩基配列を有する請求項5記載のポリヌクレオチド。
 - 8. 請求項5記載のポリヌクレオチトを含有する組換えベクター。
 - 9. 請求項8記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
- 20 10.請求項9記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。
 - 11. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
- 25 12. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性 化する中和抗体である請求項11記載の抗体。
 - 13. 請求項11記載の抗体を含有してなる診断薬。
 - 14. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項1記載のG蛋白

質共費型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、

- 15. 請求項14記載のG蛋白質共産型レセプターのリガンドを含有してなる医薬。
- 16.請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしては請求項4記載の 5 部分パプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共 役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。
 - 17. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
 - 18. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしては請求項4記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
- 15 19. 請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られつるリカンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。
 - 20. 請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリカンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセ
- 20 プター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。
 - 2.1. 請求項5記載のポリヌクレオチトとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。
- 2.2. 請求項5記載のホリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含 25 有してなるポリヌクレオチド。
 - 23. 請求項5記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法。
 - 24. 請求項11記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質 共役型レセプター蛋白質の定量方法。

ā

- 25. 請求項23または請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプターの機能が関連する疾患の診断方法。
- 26. 請求項23記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 27. 請求項24記載の定量方法を用いることを特徴とする細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 28. 請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載の 10 G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。
 - 29. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはそ の塩。
- 30.請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載の 15 G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含 有してなる医薬。
 - 31. 請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはそ の塩を含有してなる医薬。
- 20 3 2. 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤である請求項20、30または31記載の医薬。
 - 33. 哺乳動物に対して、請求項17記載のスクリーニング方法または請求項1 8記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載の G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物ま
- 25 たはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療方法。
 - 34. 哺乳動物に対して、請求項26記載のスクリーニング方法を用いて得られ うる請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合 物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性疾患、循

WO 02/04640 PCT/JP01/05878

環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療方法。 35. 哺乳動物に対して、請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られ うる細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化さ せる化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする中枢疾患、炎症性 疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療方法。

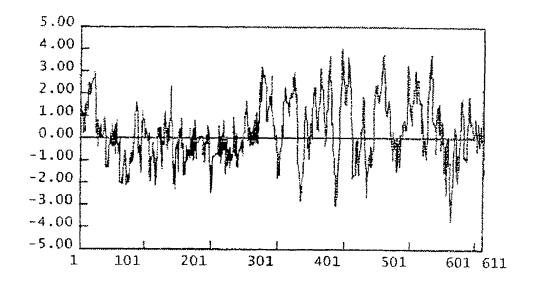
36. 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤を製造するための請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られうるリガンドと請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の使用。

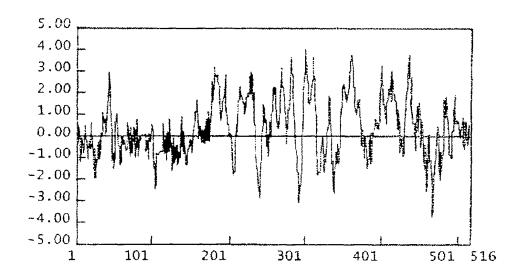
10

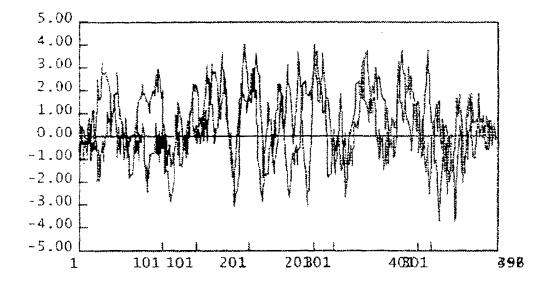
15

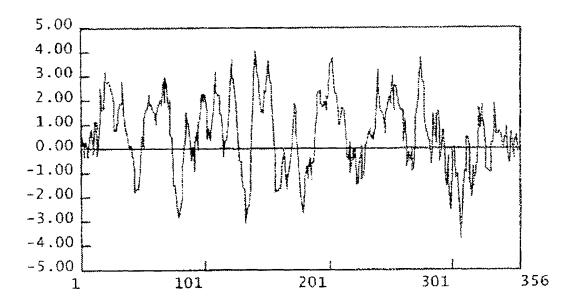
20

- 37. 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または 消化器系疾患の予防・治療剤を製造するための請求項26記載のスクリーニング 方法を用いて得られうる請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現 量を変化させる化合物またはその塩の使用。
- 38. 中枢疾患、炎症性疾患、循環器疾患、癌、代謝性疾患、免疫系疾患または消化器系疾患の予防・治療剤を製造するための請求項27記載のスクリーニング方法を用いて得られうる細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩の使用。









MIVFLVFKHLFSLRLITMFFLLHFIVLINVKDFALTQGSMITPSCQKGYFPCGNLTKC LPRAFHCDGKDDCGNGADEENCGDTSGWATIFGTVHGNANSVALTQECLLKQYPQ CCDCKETELECVNGDLKSVPMISNNVTLLSLKKNKIHSLPDKVFIKYTKLKKMDLS SNTITELSPHLFKDLKLLQKLNLSSNPLMYLHKNQFESLKQLQSLDLERIEIPNINT RMFQPMKNLSHIYFKNFRYCSYAPHVRICMPLTDGISSFEDLLANNILRIFVWVIAFI TCFGNLFVIGMRSFIKAENTTHAMSIKILCCADCLMGVYLFFVGIFDIKYRGQYQKY ALLWMESVQCRLMGFLAMLSTEVSVLLLTYLTLEKFLVIVFPFSNIRPGKRQTSVILI CIWMAGFLIAVIPFWNKDYFGNFYGKNGVCFPLYYDQTEDIGSKGYSLGIFLGVNLL AFLIIVFSYITMFCSIQKTALQTTEVRNCFGREVAVANRFFFIVFSDAICWIPVFVVKI LSLFRVEIPDTMTSWIVIFFLPVNSALNPILYTLTTNFFKDKLKQLLHKHQRKSIFKI KKKSLSTSIVWIEDSSSLKLGVLNKITLGDSIMKPVS

WO 02-04640 PCT JP01-05878

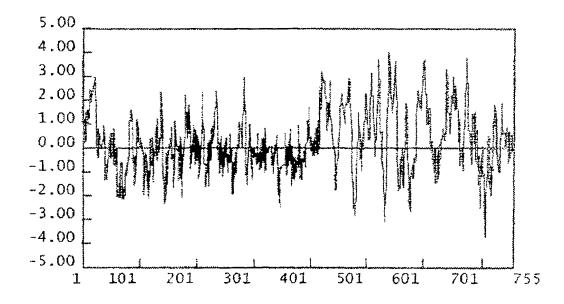
6/13

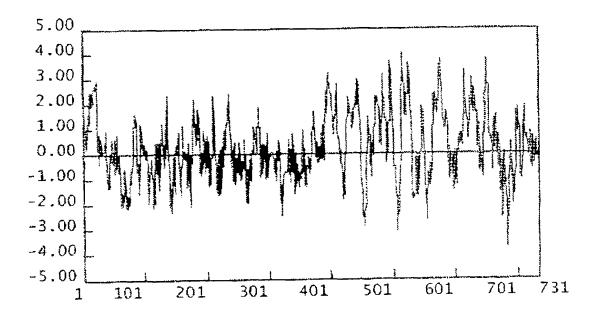
図 6

MVNNYLEALPKQMCAQMPQLNWVDLEGNRIKYLTNSTFLSCDSLTVLFLPRNQ IGFVPEKTFSSLKNLGELDLSSNTITELSPHLFKDLKLLQKLNLSSNPLMYLHKN QFESLKQLQSLDLERIEIPNINTRMFQPMKNLSHIYFKNFRYCSYAPHVRICMPLT DGISSFEDLLANNILRIFVWVIAFITCFGNLFVIGMRSFIKAENTTHAMSIKILCCA DCLMGVYLFFVGIFDIKYRGQYQKYALLWMESVQCRLMGFLAMLSTEVSVLLL TYLTLEKFLVIVFPFSNIRPGKRQTSVILICIWMAGFLIAVIPFWNKDYFGNFYGK NGVCFPLYYDQTEDIGSKGYSLGIFLGVNLLAFLIIVFSYITMFCSIQKTALQTTE VRNCFGREVAVANRFFFIVFSDAICWIPVFVVKILSLFRVEIPDTMTSWIVIFFLPV NSALNPILYTLTTNFFKDKLKQLLHKHQRKSIFKIKKKSLSTSIVWIEDSSSLKLG VLNKITLGDSIMKPVS

MVNNYLEALPKQMCAQMPQLNWVDLEGNRIKYLTNSTFLSCDSLTVLDLSSNT
ITELSPHLFKDLKLLQKLNLSSNPLMYLHKNQFESLKQLQSLDLERIEIPNINTRM
FQPMKNLSHIYFKNFRYCSYAPHVRICMPLTDGISSFEDLLANNILRIFVWVIAFIT
CFGNLFVIGMRSFIKAENTTHAMSIKILCCADCLMGVYLFFVGIFDIKYRGQYQ
KYALLWMESVQCRLMGFLAMLSTEVSVLLLTYLTLEKFLVIVFPFSNIRPGKRQT
SVILICIWMAGFLIAVIPFWNKDYFGNFYGKNGVCFPLYYDQTEDIGSKGYSLGI
FLGVNLLAFLIIVFSYITMFCSIQKTALQTTEVRNCFGREVAVANRFFFIVFSDAIC
WIPVFVVKILSLFRVEIPDTMTSWIVIFFLPVNSALNPILYTLTTNFFKDKLKQLLH
KHQRKSIFKIKKKSLSTSIVWIEDSSSLKLGVLNKITLGDSIMKPVS

MPLTDGISSFEDLLANNILRIFVWVIAFITCFGNLFVIGMRSFIKAENTTHAMSIKI LCCADCLMGVYLFFVGIFDIKYRGQYQKYALLWMESVQCRLMGFLAMLSTEV SVLLLTYLTLEKFLVIVFPFSNIRPGKRQTSVILICIWMAGFLIAVIPFWNKDYFGN FYGKNGVCFPLYYDQTEDIGSKGYSLGIFLGVNLLAFLIIVFSYITMFCSIQKTAL QTTEVRNCFGREVAVANRFFFIVFSDAICWIPVFVVKILSLFRVEIPDTMTSWIVIF FLPVNSALNPILYTLTTNFFKDKLKQLLHKHQRKSIFKIKKKSLSTSIVWIEDSSSL KLGVLNKITLGDSIMKPVS





11 /13

図 11

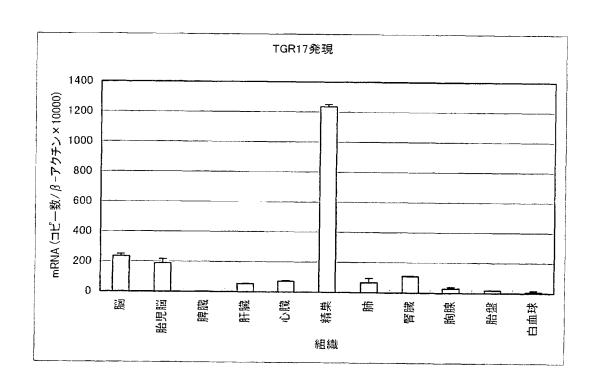
MIVFLVFKHLFSLRLITMFFLLHFIVLINVKDFALTQGSMITPSCQKGYFPCGNLTKCLPRAFHCDGKDD
CGNGADEENCGDTSGWATIFGTVHGNANSVALTQECLLKQYPQCCDCKETELECVNGDLKSVPMISNNVT
LLSLKKNKIHSLPDKVFIKYTKLKKIFLQHNCIRHISRKAFFGLCNLQILYLNHNCITTLRPGIFKDLHQ
LTWLILDDNPITRISQRLFTGLNSLFFLSMVNNYLEALPKQMCAQMPQLNWVDLEGNRIKYLTNSTFLSC
DSLTVLFLPRNQIGFVPEKTFSSLKNLGELDLSSNTITELSPHLFKDLKLLQKLNLSSNPLMYLHKNQFE
SLKQLQSLDLERIEIPNINTRMFQPMKNLSHIYFKNFRYCSYAPHVRICMPLTDGISSFEDLLANNILRI
FVWVIAFITCFGNLFVIGMRSFIKAENTTHAMSIKILCCADCLMGVYLFFVGIFDIKYRGQYQKYALLWM
ESVQCRLMGFLAMLSTEVSVLLLTYLTLEKFLVIVFPFSNIRPGKRQTSVILICIWMAGFLIAVIPFWNK
DYFGNFYGKNGVCFPLYYDQTEDIGSKGYSLGIFLGVNLLAFLIIVFSYITMFCSIQKTALQTTEVRNCF
GREVAVANRFFFIVFSDAICWIPVFVVKILSLFRVEIPDTMTSWIVIFFLPVNSALNPILYTLTTNFFKD
KLKQLLHKHQRKSIFKIKKKSLSTSIVWIEDSSSLKLGVLNKITLGDSIMKPVS

図 12

MIVFLVFKHLFSLRLITMFFLLHFIVLINVKDFALTQGSMITPSCQKGYFPCGNLTKCLPRAFHCDGKDD CGNGADEENCGDTSGWATIFGTVHGNANSVALTQECLLKQYPQCCDCKETELECVNGDLKSVPMISNNVT LLSLKKNKIHSLPDKVFIKYTKLKKIFLQHNCIRHISRKAFFGLCNLQILYLNHNCITTLRPGIFKDLHQ LTWLILDDNPITRISQRLFTGLNSLFFLSMVNNYLEALPKQMCAQMPQLNWVDLEGNRIKYLTNSTFLSC DSLTVLDLSSNTITELSPHLFKDLKLLQKLNLSSNPLMYLHKNQFESLKQLQSLDLERIEIPNINTRMFQ PMKNLSHIYFKNFRYCSYAPHVRICMPLTDGISSFEDLLANNILRIFVWVIAFITCFGNLFVIGMRSFIK AENTTHAMSIKILCCADCLMGVYLFFVGIFDIKYRGQYQKYALLWMESVQCRLMGFLAMLSTEVSVLLLT YLTLEKFLVIVFPFSNIRPGKRQTSVILICIWMAGFLIAVIPFWNKDYFGNFYGKNGVCFPLYYDQTEDIGSKGYSLGIFLGVNLLAFLIIVFSYITMFCSIQKTALQTTEVRNCFGREVAVANRFFFIVFSDAICWIPV FVVKILSLFRVEIPDTMTSWIVIFFLPVNSALNPILYTLTTNFFKDKLKQLLHKHQRKSIFKIKKKSLST SIVWIEDSSSLKLGVLNKITLGDSIMKPVS

 13×13

図 13



SEQUENCE LISTING

Takeda Chemical Industries, Ltd.

[120] Novel G Protein-Coupled Receptor protein and its DNA

±130 + P2001=161=PCT

· 150. JP 2000-211989

151. 2000-07-07

150 · JP 2000-383794

35

151 2000-12-18

< 160 - 21

< 210 > 1

- 211 - 610

-213≥ Human

< 100 > 1

Met 11e Val Phe Leu Val Phe Lys His Leu Phe Ser Leu Arg Leu 11e

5 10 15

Thr Met Phe Leu Leu His Phe Ile Val Leu Ile Asn Val Lys Asp
20 25 30

Phe Ala Leu Thr Gln Gly Ser Met Ile Thr Pro Ser Cys Gln Lys Gly

45

40

Tyr Phe Pro Cys Gly Asn Leu Thr Lys Cys Leu Pro Arg Ala Phe His 50 55 60

Cys Asp Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asn Gly Ala Asp Glu Glu Asn Cys

65 70 75 80

Gly Asp Thr Ser Gly Trp Ala Thr Ile Phe Gly Thr Val His Gly Asn
85 90 95

Ala Asn Ser Val Ala Leu Thr Gln Glu Cys Leu Leu Lys Gln Tyr Pro 100 105 110

Gln Cys Cys Asp Cys Lys Glu Thr Glu Leu Glu Cys Val Asn Gly Asp

		115					120					125			
Leu	Lys	Ser	Val	Pro	Met	He	Ser	Asn	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu
	130					135					140				
Lys	Lys	Asn	Lys	He	His	Ser	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Phe	He	Lys	Tyr
145					150					155					160
Thr	Lys	Leu	Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn	Thr	Ile	Thr	Glu	Leu
				165					170					175	
Ser	Pro	His	Leu	Phe	Lys	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Gln	Lys	Leu	Asn	Leu
			180					185					190		
Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Me t	Tyr	Leu	His	Lys	Asn	Gln	Phe	Glu	Ser	Leu
		195					200					205			
Lys	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ile	Glu	Ile	Pro	Asn	Ile
	210					215					220				
Asn	Thr	Arg	Met	Phe	Gln	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Ser	His	He	Tyr	Phe
225					230					235					240
Lys	Asn	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Ala	Pro	His	Val	Arg	He	Cys	Me t
				245					250					255	
Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	Ile	Ser	Ser	Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Ala	Asn	Asn
			260					265					270		
Ile	Leu	Arg	Ile	Phe	Val	Trp	Val	He	Ala	Phe	Ile	Thr	Cys	Phe	Gly
		275					280					285			
Asn		Phe	Val	He	Gly	Met	Arg	Ser	Phe	He		Ala	Glu	Asn	Thr
	290					295					300				
	His	Ala	Met	Ser		Lys	He	Leu	Cys		Ala	Asp	Cys	Leu	
305		_	_		310					315					320
Gly	Val	Tyr	Leu		Phe	Val	Gly	He		Asp	He	Lys	Tyr		Gly
.	•		-	325			_	_	330		_			335	
Gln	Tyr	Gln		Tyr	Ala	Leu	Leu		Met	Glu	Ser	Val		Cys	Arg
			340					345					350		

Leu	Me t	Gly	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Ser	Thr	GTu	Val	Ser	Val	Leu	Leu
		355					360					365			
Leu	Thr	Туr	Leu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Leu	Val	He	Val	Phe	Pro	Phe
	370					375					380				
Ser	Asn	He	Arg	Pro	Gly	Lys	Arg	Gln	Thr	Ser	Val	He	Leu	He	Cys
385					390					395					400
He	Trp	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	He	Ala	Val	He	Pro	Phe	Trp	Asn	Lys
				405					410					415	
Asp	Tyr	Phe	Gly	Asıı	Plie	Туг	Gly	Lys	Asn	Gly	Vai	Cys	Phe	Pro	Leu
			420					425					430		
Туг	Tyr	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp	He	Gly	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly
		435					440					445			
He	Phe	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	He	He	Val	Phe	Ser
	450					455					460				
Tyr	He	Thr	Met	Phe	Суѕ	Ser	He	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Thr	Thr
465					470					475					480
Glu	Val	Arg	Asn	Cys	Phe	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Arg	Phe
				485					490					495	
Phe	Phe	He	Val	Phe	Ser	Asp	Ala	He	Cys	Trp	He	Pro	Val	Phe	Val
			500					505					510		
Val	Lys	He	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Val	Glu	He	Pro	Asp	Thr	Met	Thr
		515					520					525			
Ser	Trp	He	Val	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Val	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro
	530					535					540				
Ile	Leu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Phe	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Lys	Gln
545					550					555					560
Leu	Leu	His	Lys	His	Gln	Arg	Lys	Ser	He	Phe	Lys	He	Lys	Lys	Lys
				565					570					575	
Ser	Len	Ser	Thr	Ser	He	Val	Trn	He	G1n	Asn	Ser	Ser	Ser	Len	Tyrs

580 585 590

Leu Gly Val Leu Asn Lys IIe Thr Leu Gly Asp Ser IIe Met Lys Pro
595 600 605

Val Ser

610

< 210 > 2

211 1830

- 212 · DNA

-,213 · Human

 $<400 \cdot 2$

atgaitgitt ttotggtttt taaacatoto ttoagootoa gattgattac aatgttottt 60 ctacticatt teategitet gateaatgie aaagattiig cactgactea aggiageatg 120 arcaciccit catgocaaaa aggatatttt ccctgtggga atettaccaa gtgcttaccc 180 cgagettite actgtgatgg caaggatgae tgtgggaacg gggcggacga agagaactgt 240 ggtgacacta gtggatggc gaccatattt ggcacagtgc atggaaatgc taacagcgtg 300 geettaacae aggagtgeet tetaaaacag tatecacaat getgtgaetg caaagaaact 360 gaatiggaat gigtaaaigg igacitaaag icigigccga igatitciaa caaigigaca 420 ttactgtctc ttaagaaaaa caaaatccac agtcttccag ataaagtttt catcaaatac 480 ucaaaactta aaaagatgga tetgtetage aataegataa eggaactate aceteacett 540 tttaaagact tgaagcttct acaaaagctg aacctgtcat ccaatcctct tatgtatctt 600 cacaagaacc agtitgaaag tottaaacaa ottoagtoto tagacotgga aaggatagag 660 attecaaata taaacacaeg aatgttteaa eecatgaaga atetttetea catttattte 720 aaaaactttc gatactgctc ctatgctccc catgtccgaa tatgtatgcc cttgacggac 780 ggcatttctt catttgagga cctcttggct aacaatatcc tcagaatatt tgtctgggtt 840 atagettica ttacetgett tggaaatett ttigteattg geatgagate ttieattaaa 900 gctgaaaata caactcacgc tatgtccatc aaaatccttt gttgtgctga ttgcctgatg 960 ggtgtttact tgttctttgt tggcattttc gatataaaat accgagggca gtatcagaag 1020 tatgccttgc tgtggatgga gagcgtgcag tgccgcctca tggggttcct ggccatgctg 1080

tecacegaag teletgitet getactgace tacitgacti tggagaagit eetggteati 1140 gicticccci teagtaacat tegacetgga aaaeggeaga eeleagteat ceteatiige 1200alctggatgg egggattiit aatagetgta atteeattit ggaataagga ffattiigga 1260aactittaig ggaaaaatgg agiaigtiic ccactilatt atgaccaaac agaagatatt 1320ggaagcaaag ggtattetet tggaaltite etaggigtga acttgetgge titteteate -1380atigigitti ectatattae tatgiteigi tecaiteaaa aaacegeett geagaceaca 1440gaagtaagga attgiitigg aagagaggig getgitgeaa ategiitett iittatagig 1500tictuigatg coatefgetg gaiteetgta titiglagita aaaleettic eeletteegg 1560giggaaatac cagacacaat gacticotgg atagtgatti tittectice agitaacagt 1620 gettigaate caateeteta taeteteaca accaactiti itaaggacaa giigaaacag 1680ctgctgcaca aacatcagag gaaatcaatt ttcaaaatta aaaaaaaaag tttatctaca 1740 tecatigtgt ggatagagga etectettee etgaaacttg gggttttgaa caaaataaca 1800 1830 ctiggagaca gtataatgaa accagtitcc

gtaaacctat gattgtitti ciggit

26

<210 - 3

^{211 26}

^{+212&}gt; DNA

^{3213&}gt; Artificial Sequence

^{-220&}gt;

^{+223°} Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR17-1, TGR17-5, and TGR17-6

^{400&}gt;3

<.210> 4

 $[\]langle 211 \rangle 25$

^{+ 212 +} DNA

^{4.213} Artificial Sequence

< 220.

WO 02/04640 PCT/JP01/05878 6/27 Z223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR17-1, T ER17-2. TGR17-3 and, TGR17-4. TGR17-5, and TGR17-6 $400 \cdot 4$ ctaggaaact ggtttcatta tactg 25 $\langle 210 \rangle 5$ <211>515 <212 PRT <213> Human $\langle 400 \rangle 5$ Met Val Asn Asn Tyr Leu Glu Ala Leu Pro Lys Gln Met Cys Ala Gln 5 10 Met Pro Gln Leu Asn Trp Val Asp Leu Glu Gly Asn Arg Ile Lys Tyr 20 25 30 Leu Thr Asn Ser Thr Phe Leu Ser Cys Asp Ser Leu Thr Val Leu Phe 35 40 45 Leu Pro Arg Asn Gln Ile Gly Phe Val Pro Glu Lys Thr Phe Ser Ser 50 55 60 Leu Lys Asn Leu Gly Glu Leu Asp Leu Ser Ser Asn Thr Ile Thr Glu

65 70 75 80

Leu Ser Pro His Leu Phe Lys Asp Leu Lys Leu Leu Gln Lys Leu Asn 85 90 95

Leu Ser Ser Asn Pro Leu Met Tyr Leu His Lys Asn Gln Phe Glu Ser 100 105 110

Leu Lys Gln Leu Gln Ser Leu Asp Leu Glu Arg Ile Glu Ile Pro Asn 115 120 125

Ile Asn Thr Arg Met Phe Gln Pro Met Lys Asn Leu Ser His Ile Tyr 130 135 140

Phe Lys Asn Phe Arg Tyr Cys Ser Tyr Ala Pro His Val Arg Ile Cys

145					150					155					160
Me t	Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	He	Ser	Ser	Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Ala	Asn
				165					170					175	
Asn	He	Leu	Arg	He	Phe	Val	Trp	Val	He	Ala	Phe	He	Thr	Cys	Phe
			180					185					190		
Gly	Asn	Leu	Phe	Val	He	Gly	Met	Arg	Ser	Phe	He	Lys	Ala	Glu	Asn
		195					200					205			
Thr	Thr	His	Ala	Met	Ser	He	Lys	He	Leu	Cys	Cys	Ala	Asp	Cys	Leu
	210					215					220				
Me t	Gly	Val	Туг	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	He	Phe	Asp	He	Lys	Туr	Arg
225					230					235					240
Gly	Gln	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Ala	Leu	Leu	Trp	Met	Glu	Ser	Val	Gln	Cys
				245					250					255	
Arg	Leu	Met	Gly	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Val	Leu
			260					265					270		
Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Leu	Val	He	Val	Phe	Pro
		275					280					285			
Phe	Ser	Asn	He	Arg	Pro	Gly	Lys	Arg	Gln	Thr	Ser	Val	He	Leu	He
	290					295					300				
Cys	He	Trp	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	He	Ala	Val	He	Pro	Phe	Trp	Asn
305					310					315					320
Lys	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Cys	Phe	Pro
				325					330					335	
Leu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp	Ile	Gly	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Leu
			340					345					350		
Gly	Ile	Phe	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	He	Val	Phe
		355					360					365			
Ser	Tyr	He	Thr	Met	Phe	Cys	Ser	He	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Thr
	370					375					380				

Thr	Glu	Val	Arg	Asn	Cys	Phe	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Arg
385					390					395					400
Phe	Phe	Phe	He	Val	Phe	Ser	Asp	Ala	He	Cys	Trp	He	Pro	Val	Phe
				405					410					415	
Val	Val	Lys	He	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Val	Glu	He	Pro	Asp	Thr	Met
			420					425					430		
Thr	Ser	Trp	He	Val	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Val	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn
		435					440					445			
Pro	He	Leu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Phe	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Lys
	450					455					460				
Gln	Leu	Leu	His	Lys	His	Gln	Arg	Lys	Ser	Пе	Phe	Lys	Ile	Lys	Lys
465					470					475					480
Lys	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Val	Trp	Ile	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Leu
				485					490					495	
Lys	Leu	Gly	Val	Leu	Asn	Lys	Ile	Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	Ile	Me t	Lys
			500					505					510		
Pro	Val	Ser													
		515													

<210> 6

<211> 1545

<212> DNA

<213> Human

<400> 6

atggttaata actacttaga agctcttccc aagcagatgt gtgcccaaat gcctcaactc 60
aactgggtgg atttggaagg caatagaata aagtatctca caaattctac gtttctgtcg 120
tgcgattcgc tcacagtgct gtttctgcct agaaatcaaa ttggttttgt tccagagaag 180
acattttctt cattaaaaaa tttaggagaa ctggatctgt ctagcaatac gataacggaa 240
ctatcacctc acctttttaa agacttgaag cttctacaaa agctgaacct gtcatccaat 300

cetettatgt	atcttcacaa	gaaccagitt	gaaagtetta	aacaacttca	gtetetagae	360
ctggaaagga	tagagattcc	aaatataaac	acacgaatgt	ttcaacccat	gaagaatett	420
teteacatti	atticaaaaa	cittegatae	tgctcctatg	ciccccatgt	ccgaatatgt	480
atgecettga	cggacggcat	ttcttcattt	gaggacetet	tggctaacaa	tatecteaga	540
ataittgtct	gggttatage	tttcattacc	tgctttggaa	atctttttgt	cattggcatg	600
agatettica	ttaaagctga	aaatacaact	cacgctatgt	ccatcaaaat	cctttgttgt	660
gctgattgcc	tgatgggtgt	ttacttgttc	ttigtiggca	ttttcgatat	aaaataccga	720
gggcagtatc	agaagtatgc	cttgctgtgg	atggagagcg	tgcagtgccg	cctcatgggg	780
ttectggcca	tgctgtccac	cgaagtetet	gtictgciac	tgacctactt	gactttggag	840
aagttcctgg	teatigiett	ccccttcagt	aacaticgac	ctggaaaacg	gcagacctca	900
gtcatcctca	tttgcatctg	gatggcggga	tttttaatag	ctgtaattcc	attttggaat	960
aaggattatt	tiggaaactt	ttatgggaaa	aatggagtat	gtttcccact	ttattatgac	1020
caaacagaag	atattggaag	caaagggtat	tetettggaa	ttttcctagg	tgtgaacttg	1080
ctggcttttc	tcatcattgt	gttttcctat	attactatgt	tctgttccat	tcaaaaaaacc	1140
gccttgcaga	ccacagaagt	aaggaattgt	tttggaagag	aggtggctgt	tgcaaatcgt	1200
ttctttttta	tagtgttctc	tgatgccatc	tgctggattc	ctgtatttgt	agitaaaatc	1260
etttecctet	tccgggtgga	aataccagac	acaatgactt	cctggatagt	gattttttc	1320
cttccagtta	acagtgcttt	gaatccaatc	ctctatactc	tcacaaccaa	ctttttaag	1380
gacaagttga	aacagctgct	gcacaaacat	cagaggaaat	caattttcaa	aattaaaaaa	1440
aaaagittat	ctacatccat	tgtgtggata	gaggactcct	cttccctgaa	acttggggtt	1500
ttgaucaaaa	taacacttgg	agacagtata	atgaaaccag	tttcc		1545

< 210 + 7

.211 - 491

<212 > PRT

<213 : Human</pre>

·400. 7

Met Val Asn Asn Tyr Leu Glu Ala Leu Pro Lys Gln Met Cys Ala Gln

1 5 10 15

Met	Pro	Gln	Leu	Asn	Trp	Val	Asp	Leu	Glu	Gly	Asn	Arg	He	Lys	Tyr
			20					25					30		
Leu	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Cys	Asp	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	Asp
		35					40					45			
Leu	Ser	Ser	Asn	Thr	He	Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	His	Leu	Phe	Lys	Asp
	50					55					60				
Leu	Lys	Leu	Leu	Gln	Lys	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Met	Tyr
65					70					75					80
Leu	His	Lys	Asn	Gln	Phe	Glu	Ser	Leu	Lys	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp
				85					90					95	
Leu	Glu	Arg	Ile	Glu	Ile	Pro	Asn	He	Asn	Thr	Arg	Met	Phe	Gln	Pro
			100					105					110		
Met	Lys	Asn	Leu	Ser	His	He	Tyr	Phe	Lys	Asn	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser
		115					120					125			
Tyr	Ala	Pro	His	Val	Arg	Ile	Cys	Met	Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	He	Ser
	130					135					140				
Ser	Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Ala	Asn	Asn	Ile	Leu	Arg	He	Phe	Val	Trp
145					150					155					160
Val	Ile	Ala	Phe	Ile	Thr	Cys	Phe	Gly	Asn	Leu	Phe	Val	He	Gly	Met
				165					170					175	
Arg	Ser	Phe	He	Lys	Ala	Glu	Asn	Thr	Thr	His	Ala	Met	Ser	Пе	Lys
			180					185					190		
Ile	Leu	Суѕ	Cys	Ala	Asp	Cys	Leu	Met	Gly	Val	Tyr	Leu	Phe	Phe	Val
		195					200					205			
Gly	Ile	Phe	Asp	Ile	Lys	Tyr	Arg	Gly	Gln	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Ala	Leu
	210					215					220				
Leu	Trp	Met	Glu	Ser	Val	Gln	Cys	Arg	Leu	Met	Gly	Phe	Leu	Ala	Me t
225					230					235					240
Len	Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Val	Len	Len	Len	Thr	Tvr	Len	Thr	Len	Glu

				245					250					255	
Lys	Phe	Leu	Val	He	Val	Phe	Pro	Phe	Ser	Asn	He	Arg	Pro	Gly	Ly:
			260					265					270		
Arg	Gln	Thr	Ser	Val	He	Leu	He	Суѕ	He	Trp	Me t	Ala	Gly	Phe	Lei
		275					280					285			
He	Ala	Val	He	Pro	Phe	Trp	Asn	Lys	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Phe	Туі
	290					295					300				
Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Cys	Phe	Pro	Leu	Туг	Tyr	Asp	GIn	Thr	Glu	Ası
305					310					315					320
He	Gly	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	He	Phe	Leu	Gly	Val	Asn	Lei
				325					330				,	335	<u>.</u>
Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	He	Val	Phe	Ser	Tyr	Ile	Thr	Met	Phe	Cys	Ser
			340					345					350		
He	GIn	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Thr	Thr	Glu	Val	Arg	Asn	Cys	Phe	Gly
		355					360					365			
Arg	Glu	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Arg	Phe	Phe	Phe	He	Val	Phe	Ser	Asp
	370					375					380				
Ala	He	Cys	Trp	He	Pro	Val	Phe	Val	Val	Lys	He	Leu	Ser	Leu	Phe
385					390					395					400
Arg	Val	Glu	He	Pro	Asp	Thr	Met	Thr	Ser	Trp	He	Val	He	Phe	Ph€
				405					410					415	
Leu	Pro	Val	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	He	Leu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Thr
			420					425					430		
Asn	Phe		Lys	Asp	Lys	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	His	Lys	His	Gln	Arg
		435					440					445			
ĹУS		He	Phe	Lys	He	Lys	Lys	Lys	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Val
	450					455					460				
	He	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Leu	Lys	Leu	Gly	Val	Leu	Asn	Lys	He
165					470					475					480

Thr Leu Gly Asp Ser He Met Lys Pro Val Ser
485 490

< 210 - 8

211 1473

212> DNA

<213 Human

400 8

atgsttaata actacttaga agctetteee aagcagatgt gtgeecaaat geeteaacte 60 aactgggtgg atttggaagg caatagaata aagtatetea caaattetae gtttetgteg 120 igcgaticgc tcacagigci ggatetgici agcaatacga taacggaaci atcaccicac 180 ctttttaaag acttgaaget tetacaaaag etgaacetgt catecaatee tettatgtat 240 cttcacaaga accagtttga aagtcttaaa caacttcagt ctctagacct ggaaaggata 300 gagattccaa atataaacac acgaatgttt caacccatga agaatctttc tcacatttat 360 ttcaaaaact ttcgatactg ctcctatgct ccccatgtcc gaatatgtat gcccttgacg 420 gacggcattt cttcatttga ggacctcttg gctaacaata tcctcagaat atttgtctgg 480 gttatagett teattacetg etttggaaat etttttgtea ttggeatgag atettteatt 540 aaagctgaaa atacaactca cgctatgtcc atcaaaatcc tttgttgtgc tgattgcctg 600 atgggtgttt acttgttctt tgttggcati ttcgatataa aataccgagg gcagtatcag 660 aagtatgcct tgctgtggat ggagagcgtg cagtgccgcc tcatggggtt cctggccatg 720 ctgtccaccg aagtctctgt tctgctactg acctacttga ctttggagaa gttcctggtc 780 attgtcttcc ccttcagiaa cattcgacct ggaaaacgge agacctcagt catcctcatt 840 tgcatctgga tggcgggatt tttaatagct gtaattccat tttggaataa ggattatttt 900 ggaaactitt atgggaaaaa tggagtatgt ttcccacttt attatgacca aacagaagat 960 attggaagca aagggtattc tcttggaatt ttcctaggtg tgaacttgct ggcttttctc 1020 atcattgtgt tttcctatat tactatgttc tgttccattc aaaaaaccgc cttgcagacc 1080 acagaagtaa ggaattgttt tggaagagag gtggctgttg caaatcgttt cttttttata 1140 gtgttctctg atgccatctg ctggattcct gtatttgtag ttaaaatcct ttccctcttc 1200 cgggtggaaa taccagacac aatgacttcc tggatagtga tttttttcct tccagttaac 1260

agtgetttga atceaateet etataetete acaaceaact tittiaagga caagtigaaa 1320 cagetgetge acaaacatea gaggaaatea attiteaaaa tiaaaaaaaa aagtitatet 1380 acateeatig tgiggataga ggaeteetet teeetgaaac tiggggtitt gaacaaaata 1440 acaettggag acagtataat gaaaceagti tee 1473

<210> 9

211 26

+ 212 + DNA

-213 · Artificial Sequence

-220

 ± 223 . Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR17-2 and TGR17-3

-400 - 9

aiggitaata actacttaga agetet

26

-210 - 10

+211 + 355

+ 212> PRT

< 213> Human

< 400 > 10

Met Pro Leu Thr Asp Gly Ile Ser Ser Phe Glu Asp Leu Leu Ala Asn 1 5 10 15

Asn Ile Leu Arg Ile Phe Val Trp Val Ile Ala Phe Ile Thr Cys Phe

20 25 30

Gly Asn Leu Phe Val Ile Gly Met Arg Ser Phe Ile Lys Ala Glu Asn

35 40 45

Thr Thr His Ala Met Ser Ile Lys Ile Leu Cys Cys Ala Asp Cys Leu

50 55

Met Gly Val Tyr Leu Phe Phe Val Gly Ile Phe Asp Ile Lys Tyr Arg

65					70					75					80
Gly	Gln	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Ala	Leu	Leu	Trp	Met	Glu	Ser	Val	Gln	Cys
				85					90					95	
Arg	Leu	Me t	Gly	Phe	Leu	Ala	Me t	Leu	Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Val	Leu
			100					105					110		
Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Leu	Val	Ile	Val	Phe	Pro
		115					120					125			
Phe	Ser	Asn	He	Arg	Pro	Gly	Lys	Arg	Gln	Thr	Ser	Val	He	Leu	He
	130					135					140				
Cys	lle	Trp	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	Ile	Ala	Val	Ile	Pro	Phe	Trp	Asn
145					150					155					160
Lys	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Cys	Phe	Pro
				165					170					175	
Leu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp	Ile	Gly	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	He	Phe	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	He	He	Val	Phe
		195					200					205			
Ser	Tyr	Ile	Thr	Met	Phe	Cys	Ser	Ile	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Thr
	210					215					220				
Thr	Glu	Val	Arg	Asn	Cys	Phe	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Arg
225					230					235					240
Phe	Phe	Phe	Ile	Val	Phe	Ser	Asp	Ala	He	Cys	Trp	He	Pro	Val	Phe
				245					250					255	
Val	Val	Lys	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Val	Glu	He	Pro	Asp	Thr	Met
			260					265					270		
Thr	Ser	Trp	He	Val	He	Phe	Phe	Leu	Pro	Val	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn
		275					280					285			
01 ²	Ile	Leu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Phe	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Lys
	290					295					300				

Gln Leu Leu His Lys His Gln Arg Lys Ser He Phe Lys He Lys Lys 305 310 315 320 Lys Ser Leu Ser Thr Ser He Val Tro He Glu Asp Ser Ser Ser Leu

Lys Ser Leu Ser Thr Ser He Val Trp He Glu Asp Ser Ser Ser Leu 325 330 335

Lys Leu Gly Val Leu Asn Lys IIe Thr Leu Gly Asp Ser IIe Met Lys 340 345 350

Pro Val Ser

355

210 · 11

1211 - 1065

212 DNA

<213> Human

400 11

60 atgecettga eggaeggeat ttetteatti gaggaeetet tggetaacaa tateeteaga atatttgtct gggttatagc tttcattacc tgctttggaa atctttttgt cattggcatg 120 agatettica itaaagetga aaatacaaci caegetatgi ecateaaaai eetiigiigi 180 getgattgee tgatgggtgt ttacitgtte ttigtiggea tttiegatat aaaataeega 240 gggcugtate agaagtatge ettgetgtgg atggagageg tgeagtgeeg eeteatgggg 300 ticciggeca tgctgtccac cgaagtetei gitetgetac tgacetacit gaetttggag 360 aagtteetgg teattgtett eccetteagt aacattegae etggaaaaeg geagaeetea 420 480 gtcarcetca titgcatetg gatggeggga titttaatag eigtaatiee attitggaat uaggattatt ttggaaactt ttatgggaaa aatggagtat gitteecact ttattatgae 540 600 caaacagaag atatiggaag caaagggtat teteitggaa titteetagg tgigaactig ctggcttiic tcatcattgt gttttcctat attactatgt tctgttccai tcaaaaaaacc 660 gcctigcaga ccacagaagt aaggaattgt titggaagag aggtggctgt tgcaaatcgt 720780 ticiittita tagigticic igatgocale igeiggatte eigiatiigi agitaaaate cttlccctct tccgggtgga aataccagac acaatgactt cctggatagt gatttttttc 840 cttccagtta acagigetti gaatecaate etetataete teacaaceaa ettitttaag 900

gacaagttga aacagetget geacaaacat eagaggaaat eaattiteaa aattaaaaaa 960 aaaagttiat etacateeat tgigtggata gaggaeteet etteeetgaa aettggggtt 1020 ttgaacaaaa taacaettgg agacagtata atgaaaceag tttee 1065

210 12

<211> 22

..212 > DNA

+213 Artificial Sequence

-220 +

+ 223 Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR17-4

-400 - 12

atgecettga eggaeggeat tt

22

· 210 · 13

 $\pm 211 - 754$

+ 212 - PRT

- 213 Human

400 13

Met Ile Val Phe Leu Val Phe Lys His Leu Phe Ser Leu Arg Leu Ile

5

10

15

Thr Met Phe Phe Leu Leu His Phe Ile Val Leu Ile Asn Val Lys Asp

20

25

30

Phe Ala Leu Thr Gln Gly Ser Met Ile Thr Pro Ser Cys Gln Lys Gly

35

40

45

Tyr Phe Pro Cys Gly Asn Leu Thr Lys Cys Leu Pro Arg Ala Phe His

50

55

60

Cys Asp Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asn Gly Ala Asp Glu Glu Asn Cys

65

70

75

80

Gly Asp Thr Ser Gly Trp Ala Thr Ile Phe Gly Thr Val His Gly Asn

				85					90					95	
A a	Asn	Ser	Val	Ala	Leu	Thr	Gln	Glu	Cys	Leu	Leu	Lys	GIn	Tyr	Pro
			100					105					110		
Gln	Cys	Cys	Asp	Суѕ	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Cys	Val	Asn	Gly	Asp
		115					120					125			
Leu	Lys	Ser	Val	Pro	Me t	He	Ser	Asn	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu
	130					135					140				
Lys	Lys	Asn	Lys	He	His	Ser	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Phe	He	Lys	Tyr
145					150					155					160
Thr	Lys	Leu	Lys	Lys	He	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Cys	He	Arg	His	He
				165					170					175	
Ser	Arg	Lys	Ala	Phe	Phe	Gly	Leu	Cys	Asn	Leu	Gln	Ile	Leu	Tyr	Leu
			180					185					190		
Asn	His	Asn	Cys	Ile	Thr	Thr	Leu	Arg	Pro	Gly	He	Phe	Lys	Asp	Leu
		195					200					205			
His	Gln	Leu	Thr	Trp	Leu	Пе	Leu	Asp	Asp	Asn	Pro	He	Thr	Arg	He
	210					215					220				
Ser	Gln	Arg	Leu	Phe	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Met
225					230					235					240
Val	Asn	Asn	Tyr	Leu	Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Gln	Me t	Cys	Ala	Gln	Me t
				245					250					255	
Pro	GIn	Leu	Asn	Trp	Val	Asp	Leu	Glu	Gly	Asn	Arg	He	Lys	Туr	Leu
			260					265					270		
Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Leu	Ser	Cys	Asp	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	Phe	Leu
		275					280					285			
Pro	Arg	Asn	Gln	He	Gly	Phe	Val	Pro	Glu	Lys	Thr	Phe	Ser	Ser	Leu
	290					295					300				
Lys	Asn	Leu	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn	Thr	Ile	Thr	GIu	Leu
305					310					315					320

Ser	Pro	His	Leu	Phe	Lys	Asp	Leu	Lys	Leu	Leu	Gln	ГЛЗ	Leu	Asn	Leu
				325					330					335	
Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Met	Tyr	Leu	His	Lys	Asn	Gln	Phe	Glu	Ser	Leu
			340					345					350		
Lys	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ile	Glu	He	Pro	Asn	He
		355					360					365			
Asn	Thr	Arg	Me t	Phe	Gln	Pro	Met	Lys	Asn	Leu	Ser	His	He	Tyr	Phe
	370					375					380				
Lys	Asn	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Туr	Ala	Pro	His	Val	Arg	Ile	Cys	Met
385					390					395					400
Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	He	Ser	Ser	Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Ala	Asn	Asn
				405					410					415	
Пе	Leu	Arg	Ile	Phe	Val	Trp	Val	He	Ala	Phe	Ile	Thr	Cys	Phe	Gly
			420					425					430		
Asn	Leu	Phe	Val	He	Gly	Met	Arg	Ser	Phe	He	Lys	Ala	Glu	Asn	Thr
		435					440					445			
Thr	His	Ala	Met	Ser	He	Lys	Ile	Leu	Суѕ	Cys	Ala	Asp	Cys	Leu	Met
	450					455					460				
Gly	Val	Tyr	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	He	Phe	Asp	He	Lys	Tyr	Arg	Gly
465					470					475					480
Gln	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Ala	Leu	Leu	Trp	Met	Glu	Ser	Val	Gln	Cys	Arg
				485					490					495	
Leu	Met	Gly	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Val	Leu	Leu
			500					505					510		
Leu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Leu	Val	Ile	Val	Phe	Pro	Phe
		515					520					525			
Ser		He	Arg	Pro	Gly	Lys	Arg	Gln	Thr	Ser	Val	He	Leu	He	Cys
	530					535					540				
Ile	Trp	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	Ile	Ala	Val	He	Pro	Phe	Trp	Asn	Lys

545					550					555					560
Asp	Туг	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Cys	Phe	Pro	Leu
				565					570					575	
Tyr	Туг	Asp	Gln	Thr	Glu	Asp	He	Gly	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly
			580					585					590		
He	Phe	Leu	Gly	Val	Asn	Leu	Leu	Ala	Phe	Leu	He	He	Val	Phe	Ser
		595					600					605			
Tyr	He	Thr	Met	Phe	Cys	Ser	He	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Thr	Thr
	610					615					620				
Glu	Val	Arg	Asn	Cys	Phe	Gly	Arg	Glu	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Arg	Phe
625					630					635					640
Phe	Phe	He	Val	Phe	Ser	Asp	Ala	He	Cys	Trp	He	Pro	Val	Phe	Val
				645					650					655	
Val	Lys	He	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Val	Glu	He	Pro	Asp	Thr	Met	Thr
			660					665					670		
Ser	Trp	He	Val	He	Phe	Phe	Leu	Pro	Val	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro
		675					680					685			
He	Leu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn	Phe	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Lys	Gln
	690					695					700				
Leu	Leu	His	Lys	His	Gln	Arg	Lys	Ser	He	Phe	Lys	He	Lys	Lys	Lys
705					710					715					720
Ser	Leu	Ser	Thr		He	Val	Trp	He		Asp	Ser	Ser	Ser		Lys
				725					730					735	
Leu	Gly	Val	Leu	Asn	Lys	He	Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	He	Me t	Lys	Pro
			740					745					750		
Val															
	754														

+(211 - 2262)

-(212) - DNA

- 213} Human

 $(400) \cdot 14$

utgattgitt ttctggittt taaacatctc ttcagcctca gattgattac aatgitcttt 60 ctacticati tcatcgitci gaicaatgic aaagattitg cactgacica aggtagcatg 120 atcactectt catgecaaaa aggatatttt ceetgtggga atettaccaa gtgettacce 180 cgagcttttc actgtgatgg caaggatgac tgtgggaacg gggcggacga agagaactgt 240 ggtgacacta gtggatggc gaccatattt ggcacagtgc atggaaatgc taacagcgtg 300 gccttaacac aggagtgcct tctaaaacag tatccacaat gctgtgactg caaagaaact 360 gaattggaat gtgtaaatgg tgacttaaag tctgtgccga tgatttctaa caatgtgaca 420 ttacigicic ttaagaaaaa caaaatccac agicticcag ataaagiitti catcaaatac 480 acaaaactta aaaagatatt tetteageat aattgeatta gacacatate caggaaagea 540 ttttttggat tatgtaatct gcaaatatta tatctcaacc acaactgcat cacaaccctc 600 agacctggaa tattcaaaga cttacatcag ctaacttggc taattctaga tgacaatcca 660 ataaccagaa titcacagcg citgittacg ggattaaatt ccitgittit ccigictatg -720gttaataact acttagaage tetteecaag cagatgtgtg cecaaatgee teaactcaac 780 tgggtggatt tggaaggcaa tagaataaag tatctcacaa attctacgtt tctgtcgtgc 840 gattegetea eagtgetgtt tetgeetaga aateaaattg gttttgttee agagaagaea 900 ttticticat taaaaaatti aggagaacig gatcigicta gcaatacgat aacggaacta -960teaceteace tittiaaaga ettgaageti etacaaaage tgaacetgie atceaateet 1020 citatgiate iteacaagaa eeagittgaa agiettaaae aacticagie tetagaeetg 1080 gaaaggatag agattccaaa tataaacaca cgaatgtttc aacccatgaa gaatctttct 1140 cacatttatt tcaaaaactt tcgatactgc tcctatgctc cccatgtccg aatatgtatg 1200 cccttgacgg acggcatttc ttcatttgag gacctcttgg ctaacaatat cctcagaata 1260 titgtctggg ttatagcttt cattacctgc tttggaaatc tttttgtcat tggcatgaga 1320 tettteatta aagetgaaaa tacaacteae getatgteea teaaaateet ttgttgtget 1380 gattgcctga tgggtgttta citgttcttt gttggcattt tcgatataaa ataccgaggg 1440 cagtatcaga agtatgcctt gctgtggatg gagagcgtgc agtgccgcct catggggttc 1500

ctggccatge tigtecacega agtetetit etgetactga cetacitgae ittigaagaag 1560
ticctggtea tigtetteee etteagiaac attegacetg gaaaaceggea gaceteagte 1620
atecteatit gealetigaat ggeggatti itaatagetg taatteeatt tiggaalaag 1680
gattattitig gaaactitta tiggaaaaaat ggagtatgit teecactita tiatgaceaa 1740
acagaagata tiggaageaa agggiattet ettiggaatit teetaagigi gaactigetg 1800
gettitetea teatigigit tiectatati aciatgitet giteeattea aaaaacegee 1860
tigeagacea cagaagtaag gaattigitti ggaagagagg tiggetigitee aaategitte 1920
tittitatag tigtetetga tigeeatetge tiggatteetg tattigiagi taaaaateett 1980
teecietiee gggiggaaat accagacaca atgactieet ggatagtgat tittiteett 2040
ceagitaaca gigetitgaa teeaateete tatactetea caaceaacti tittaaggae 2100
aagtigaaac agetgetgea caaacateag aggaaateaa titticaaaat taaaaaaaaa 2160
agtitateta cateeatigt giggatagag gacteetett eeetgaact tiggggittig 2220
aacaaaataa cactiggaga cagtataatig aaaceagtti ee

 $-210 \cdot 15$

211 730

<212 PRT

213 Human

5

400 : 15

Met 11e Val Phe Leu Val Phe Lys His Leu Phe Ser Leu Arg Leu I1e

10 15

Thr Met Phe Phe Leu Leu His Phe Ile Val Leu Ile Asn Val Lys Asp
20 25 30

Phe Ala Leu Thr Gln Gly Ser Met Ile Thr Pro Ser Cys Gln Lys Gly
35 40 45

Tyr Phe Pro Cys Gly Asn Leu Thr Lys Cys Leu Pro Arg Ala Phe His
50 55 60

Cys Asp Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asn Gly Ala Asp Glu Glu Asn Cys

65 70 75 80

Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Trp	Ala	Thr	He	Phe	Gly	Thr	Val	His	Gly	Asn	
				85					90					95		
Ala	Asn	Ser	Val	Ala	Leu	Thr	Gln	Glu	Cys	Leu	Leu	Lys	G1n	Tyr	Pro	
			100					105					110			
Gln	Cys	Суѕ	Asp	Суѕ	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Суѕ	Val	Asn	Gly	Asp	
		115					120					125				
Leu	Lys	Ser	Val	Pro	Met	He	Ser	Asn	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	
	130					135					140					
Lys	Lys	Asn	Lys	Ile	His	Ser	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Phe	He	Lys	Tyr	
145					150					155					160	
Thr	Lys	Leu	Lys	Lys	Ile	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Cys	Ile	Arg	His	Ile	
				165					170					175		
Ser	Arg	Lys	Ala	Phe	Phe	Gly	Leu	Суѕ	Asn	Leu	Gln	He	Leu	Tyr	Leu	
			180					185					190			
Asn	His	Asn	Cys	Ile	Thr	Thr	Leu	Arg	Pro	Gly	He	Phe	Lys	Asp	Leu	
		195					200					205				
His	Gln	Leu	Thr	Trp	Leu	He	Leu	Asp	Asp	Asn	Pro	He	Thr	Arg	Ile	
	210					215					220					
	Gln	Arg	Leu	Phe	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Met	
225					230					235					240	
Val	Asn	Asn	Tyr	Leu	Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Gln	Met	Cys	Ala	Gln	Me t	
				245					250					255		
Pro	Gln	Leu	Asn	Trp	Val	Asp	Leu	Glu	Gly	Asn	Arg	He	Lys	Tyr	Leu	
			260					265					270			
Thr	Asn		Thr	Phe	Leu	Ser	Cys	Asp	Ser	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Leu	
		275					280					285				
Ser	Ser	Asn	Thr	He	Thr	Glu	Leu	Ser	Pro	His	Leu	Phe	Lys	Asp	Leu	
	290					295					300					
Lys	Leu	Leu	Gln	Lys	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Met	Tvr	Leu	

305					310					315					320
His	Lys	Asn	Gln	Phe	Glu	Ser	Leu	Lys	Gln	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp	Leu
				325					330					335	
Glu	Arg	He	Glu	He	Pro	Asn	He	Asn	Thr	Arg	Me t	Phe	Gln	Pro	Me t
			340					345					350		
Lys	Asn	Leu	Ser	His	He	Tyr	Phe	Lys	Asn	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Tyr
		355					360					365			
Ala	Pro	His	Val	Arg	He	Cys	Met	Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	He	Ser	Ser
	370					375					380				
Phe	Glu	Asp	Leu	Leu	Ala	Asn	Asn	He	Leu	Arg	He	Phe	Val	Trp	Val
385					390					395					400
He	Ala	Phe	He	Thr	Cys	Phe	Gly	Asn	Leu	Phe	Val	Ile	Gly	Me t	Arg
				405					410					415	
Ser	Phe	He	Lys	Ala	Glu	Asn	Thr	Thr	His	Ala	Met	Ser	He	Lys	He
			420					425					430		
Leu	Cys	Cys	Ala	Asp	Cys	Leu	Met	Gly	Val	Tyr	Leu	Phe	Phe	Val	Gly
		435					440					445			
He	Phe	Asp	He	Lys	Туг	Arg	Gly	Gln	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Ala	Leu	Leu
	450					455					460				
Trp	Met	Glu	Ser	Val	Gln	Cys	Arg	Leu	Met	Gly	Phe	Leu	Ala	Met	Leu
465					470					475					480
Ser	Thr	Glu	Val	Ser	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Thr	Leu	Glu	Lys
				485					490					495	
Phe	Leu	Val	He	Val	Phe	Pro	Phe	Ser	Asn	He	Arg	Pro	Gly	Lys	Arg
			500					505					510		
Gln	Thr	Ser	Val	He	Leu	He	Cys	He	Trp	Met	Ala	Gly	Phe	Leu	He
		515					520					525			
Ala	Val	Ile	Pro	Phe	Trp	Asn	Lys	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Phe	Туг	Gly
	530					535					540				

Lys	Asn	Gly	Val	Cys	Phe	Pro	Leu	Tyr	Туг	Asp	GIn	Thr	Glu	Asp	116
545					550					555					560
Gly	Ser	Lys	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly	He	Phe	Leu	G1y	Val	Asn	Leu	Leu
				565					570					575	
Ala	Phe	Leu	He	He	Val	Phe	Ser	Tyr	He	Thr	Met	Phe	Cys	Ser	Ile
			580					585					590		
Gln	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Thr	Thr	Glu	Val	Arg	Asn	Cys	Phe	Gly	Arg
		595					600					605			
Glu	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Arg	Phe	Phe	Phe	He	Val	Phe	Ser	Asp	Ala
	610					615					620				
Ile	Cys	Trp	He	Pro	Val	Phe	Val	Val	Lys	He	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg
625					630					635					640
Val	Glu	He	Pro	Asp	Thr	Me t	Thr	Ser	Trp	Ile	Val	Ile	Phe	Phe	Leu
				645					650					655	
Pro	Va1	Asn	Ser	Ala	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Thr	Asn
			660					665					670		
Phe	Phe	Lys	Asp	Lys	Leu	Lys	Gln	Leu	Leu	His	Lys	His	Gln	Arg	Lys
		675					680					685			
Ser	Ile	Phe	Lys	Ile	Lys	Lys	Lys	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser	Ile	Val	Trp
	690					695					700				
He	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Leu	Lys	Leu	Gly	Val	Leu	Asn	Lys	Ile	Thr
705					710					715					720
Leu	Gly	Asp	Ser	Ile	Met	Lys	Pro	Val	Ser						
				725					730						

<210> 16

<211> 2190

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

atgattgttt	tictggttit	taaacatctc	ttcagcctca	gattgattac	aatgtictti	60
ctacttcatt	teategitet	gatcaatgtc	aaagattttg	cactgactca	aggtagcatg	120
atcactcctt	catgccaaaa	aggatatttt	ccctgtggga	atcttaccaa	gtgcttaecc	180
cgagetttte	actgtgatgg	caaggatgac	tgtgggaacg	gggcggacga	agagaactgt	240
ggtgacacta	gtggatgggc	gaccatattt	ggcacagtgc	atggaaatgc	taacagcgig	300
gccttaacac	aggagtgcct	tctaaaaacag	tatccacaat	gctgtgactg	caaagaaac t	360
gaattggaat	gtgtaaatgg	tgacttaaag	tctgtgccga	tgatttctaa	caatgtgaca	420
tracigicte	t taagaaaaa	caaaatccac	agicticcag	ataaagtttt	catcaaatac	480
acaaaactta	aaaagatatt	tcttcagcat	aattgcatta	gacacatatc	caggaaagca	540
ttitriggat	tatgtaatct	gcaaatatta	tatctcaacc	acaactgcat	cacaaccctc	600
agacctggaa	tattcaaaga	cttacatcag	ctaacttggc	taattctaga	tgacaatcca	660
ataaccagaa	tttcacagcg	cttgtttacg	ggattaaatt	ccttgttttt	cctgtctatg	720
gttaataact	acttagaagc	tcttcccaag	cagatgtgtg	cccaaatgcc	tcaactcaac	780
tgggtggatt	tggaaggcaa	tagaataaag	tatctcacaa	attctacgtt	tctgtcgtgc	840
gattegetea	cagtgctgga	tctgtctagc	aatacgataa	cggaactatc	acctcacctt	900
tttaaagact	tgaagettet	acaaaagctg	aacctgtcat	ccaatectet	tatgtatctt	960
cacaagaacc	agtttgaaag	tcttaaacaa	cttcagtctc	tagacctgga	aaggatagag	1020
attccaaata	taaacacacg	aatgtttcaa	cccatgaaga	atctttctca	catttatttc	1080
aaaaactttc	gatactgctc	ctatgctccc	catgtccgaa	tatgtatgcc	cttgacggac	1140
ggcatttctt	cattigagga	cctcttggct	aacaatatcc	tcagaatatt	tgtctgggtt	1200
atagetttea	ttacctgctt	tggaaatctt	tttgtcattg	gcatgagatc	tttcattaaa	1260
gctgaaaata	caactcacgc	tatgtccatc	aaaatccttt	gttgtgctga	ttgcctgatg	1320
ggtgtttact	tgttctttgt	tggcattttc	gatataaaat	accgagggca	gtatcagaag	1380
tatgccttgc	tgtggatgga	gagcgtgcag	tgccgcctca	tggggitcct	ggccatgctg	1440
tccaccgaag	tctctgttct	gctactgacc	tacttgactt	tggagaagtt	cctggtcatt	1500
gtcttcccct	tcagtaacat	tcgacctgga	aaacggcaga	cctcagtcat	cctcatttgc	1560
atctggatgg	cgggattttt	aatagctgta	attccatttt	ggaataagga	ttattttgga	1620
aacttttatg	ggaaaaatgg	agtatgtttc	ccactttatt	atgaccaaac	agaagatatt	1680

sgaagcaaas ggraticici iggaariite eraggigtga actigergge iitteteate 1740 attgigtiit eeraaattae tatgiteigi teeaticaaa aaacegeett geagaecaca 1800 gaagtaagga attgittigg aagaagstg getgitgeaa ategitieti tittatagig 1860 tietetgatg eeatetgeet gatteetga tittgiagita aaateettie eetetieegg 1920 giggaaatae eagaecacaa gaetteetgg atagtgaiti titteettee agitaacagi 1980 gettigaate eaateeteta taeteetaea aceaaettit itaaggaeaa gitgaaacag 2040 etgetgeaca aacateagag gaaateaatt titeaaaatta aaaaaaaaag tittatetaea 2100 teeatigig ggatagagga eteetetee etgaaaettg gggtitigaa eaaaataaca 2160 ettggaggaea gitaaatgaa aceagtitee etgaaaettg gggtitigaa eaaaataaca 2160

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213 · Artificial Sequence

<220≻

<223 Designed oligonucleotide primer TGR17TQF

<400> 17

tctgctactg acctacttga ctttgg

26

 $\langle 210 \rangle 18$

<211: 22

<212> DNA

<213 Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide reverseprimer TGR17TQR

<400> 18

actgaggtct gccgttttcc ag 22

- $\langle 211 \rangle / 32$
- 212 DNA
- · 213 · Artificial Sequence
- · 220 ·
- + 223 + TGR17TQP
- + 400 + 19

teetggteat tgtetteece tteagtaaca 32

- +210 + 20
- .211 36
- $\langle 212 \rangle$ DNA
- \(\cap213 \cdot \text{Artificial Sequence}\)
- $\cdot,220 \cdot$
- $<\!223$ Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR17-1, T GR17-5, and TGR17-6
- +400 + 20

ataagtegae gtaaacetat gattgttttt etggtt

36

- $-.210 \cdot 21$
- · 211 · 35
- 1.212 · DNA
- -1213 · Artificial Sequence
- $\cdot (220 +$
- <223 Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding TGR17-1. T GR17-5, and TGR17-6
- 400 21

tgttactagt ctaggaaact ggtttcatta tactg

International application No.

PCT/JP01/05878

A. CLASS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER C1 ² C12N 15/12, 1/21, C07K 14/705, 16 48/00, A61P 1/0C, 3/0C, 9/C0, 25/2 33/566 // (C12N 1/21, C12R 1:19	8, 29/00, 35/00, 37/00, GC1N 33	A61K 38/00, 45/00, 3/15, 33/50, 33/53,					
According to	According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC							
	S SEARCHED							
Int.(Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ Cl2N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825							
	ion searched other than minimum documentation to the							
MEDI	Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq							
C. DOCUI	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		·					
Category*	Citation of document, with indication, where ap	<u>* _ * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : _ : : : : : : : : : : : _ : : : : _ : : _ : : _</u>	Relevant to claim No.					
P,X	WO 01/36471 A2 (Arena Pharmaceu 25 May, 2001 (25.05.01), & AU 200117696 A	1-18,21-24, 26-27						
Х	WO 99/48921 A1 (The Board of Tr Stanford Junior University), 30 September, 1999 (30.09.99), & EP 1066324 A1	1-18,21-24, 26-27						
А	VANDERHAEGHEN P. et al., "Molecular Cloning and Chromosomal Mapping of Olfactory Receptor Genes Expressed in the Male Germ Line: Evidence for Their Wide Distribution in the Human Genome", Biochem. Biophys. Res. Commun., (1997), Vol.237, No.2, pages 283 to 287							
A	GERARD C. M. et al., "Molecul cannabinoid receptor which is al Biochem. J., (1991), Vol.279, P	so expressed in testis",	1-18,21-24, 26-27					
Furthe	r documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.						
"A" docume	categories of cited documents: ent defining the general state of the art which is not	"T" later document published after the inte- priority date and not in conflict with the						
"E" carlier	red to be of particular relevance document but published on or after the international filing	"X" understand the principle or theory und document of particular relevance; the	claimed invention cannot be					
	ent which may throw doubts on priority claim(s) or which is	considered novel or cannot be conside step when the document is taken alone	•					
special	establish the publication date of another citation or other reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the considered to involve an inventive step	p when the document is					
means	ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	combined with one or more other such combination being obvious to a person	skilled in the art					
than the	ent published prior to the international filing date but later e priority date claimed	"&" document member of the same patent i						
26 S	actual completion of the international search september, 2001 (26.09.01)	Date of mailing of the international sear 09 October, 2001 (09						
	nailing address of the ISA/ nese Patent Office	Authorized officer						
Facsimile N	o.	Telephone No.						

International application No.

PCT/JP01/05878

li tegory*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
À	WO 00/21999 Al (Chugai Research Institute for Molecular Medicine, Inc.), 20 April, 2000 (20.04.00), & EP 1120426 Al & AU 9960063 A	1-18,21-24, 26-27

International application No.

PCT/JP01/05878

Box 1 Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:
1. Claims Nos.: 25,33-35 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
These claims involve methods for treatment of the human body by therapy
or diagnostic methods.
2. Claims Nos.: 19-20,28-32,36-38 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
in the claims, it is covered by claims 140s
Remark on Protest
No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.

PCT/JPC1/C5878

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sneet (1)

The compound or its salt as set forth in claim 19 which is capable of altering the binding properties of a ligand to the G protein coupled receptor protein or its salt as set forth in claim 1 is specified by the screening method as set forth in claim 17 or by the use of the screening kit as set forth in claim 18. Thus, it involves in its scope any compounds obtained by the above screening method and the screening kit.

However, no particular compound obtained by the above screening method and the screening kit is described in the description. Namely, claim 19 is neither supported nor disclosed by the description. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized that what particular compounds are involved in the scope and what are not. Thus, the above claim is described in a very unclear manner.

Therefore, no meaningful search can be practiced on the invention as set forth in the above claim.

The same applies to claims 20, 28 to 32 and 36 to 38.

| 国際出願番号 | PCT/ JP01/05878

				
Int Ci ⁷ C12 AC1K	展する今野の全類(国際特許冷類(I P C)) N 15/12, 1/21, 007K 14/705, 16/28, 012P 21/02, 0 C 38/00, 45/00, 48/00, A6IP 1/00, 3/00, 9/00, 25/ T2N 1/21, (12E 1:19) (C12P 21/02, C12R 1:19)		50, 23/53, 33/566	
	子った 写野 漫小限資料(国際特許:7類(IPC))			
Int. Cl ⁷ (12)	N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825			
最小限資料以外	トの資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用	目した電子データベース (データベースの名称、	調査に使用した用語)		
	INE(STM), WPI(DIALOG), BIGSIS(DIALOG) ank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSe	q	-	
C. 関連する				
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連すると	ときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Р, Х	WO 01/36471 A2 (ARENA PHARMACEUTI 25.5月,2001(25.05.01) & AU 200117696 A	1-18, 21-24, 26-27		
X	WO 99/43921 A1 (THE BOARD OF TRUS JUNIOR UNIVERSITY) 30.9月.1999(30.09.99) & EP 1066324 A1	1-18, 21-24, 26-27		
区 C欄の続き	とにも文献が列挙されている。	□ パテントファミリーに関する別	紙を参照。	
もの 「E」国際出席 以後に2 「L」優先権 日若献(E 文 ロ頭によ	のカテゴリー 国のある文献ではなく、一般的技術水準を示す 国目前の出願または特許であるが、国際出願日 公表されたもの E張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 は他の特別な理由を確立するために引用する 出由を付す) にる関示、使用、展示等に言及する文献 質目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの		
国際調査を完了	26.09.01	国際調査報告の発送日 09.1	0.01	
日本国 垂	D名称及びあて先 周特許庁(ISA/JP) B便番号100-8915 B千代田区霞が関三二目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 本間 夏子 電話番号 03-3581-1101	内線 3488	

○ (続き) .	提連すると認められる文献	
引用文献の		関連する
<u>カテゴリー*</u> A	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 VANDERHAEGHEN P. et al. Molecular Cloning and Chromosomal Mapping of Olfactory Receptor Genes Expressed in the Male Germ Line: Evidence for Their Wide Distribution in the Human Genome. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997, Vol. 237, No. 2, , p. 283-287	請求の適梱の番号 1-18, 21-24, 26-27
A	GERARD C. M. et al. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. Biochem. J. 1991, Vol. 279, Pt. 1, p. 129-134	1-18, 21-24, 26-27
Λ	WO 00/21999 A1 (株式会社 中外分子医学研究所) 20.4月.2000(20.04.00) & EP 1120426 A1 & AU 9960063 A	1-18, 21-24, 26-27

1.5	1	1117	A.,	2.5	. ±
17	11.7	nite.	101	T.	7 1

国際出願新号 PCT/JP01/05878

第1欄	菅木の範囲の一部の調査がてきないときの意見(第1ページの2の続き)
法第89	条第3項(PCT17条 22 (a) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作
1.	請求の範囲 <u>25,33-35</u> は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。 つまり、
	ヒトの治療方法又は診断方法を含むものである。
2. 🗵	請求の範囲 <u>19-20, 28-32, 36-38</u> は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、 別紙 (特別ページ)参照。
3.	請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に 従って記載されていない。
第Ⅱ概	発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)
W.C.Z.	並べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
1.	出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求 の範囲について作成した。
2.	追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追 加調査手数料の納付を求めなかった。
3.	出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.	出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の総団について作成した。
追加調査	至手数料の異議の申立てに関する注意 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第1欄2. について

請求の範囲 1.9 に記載の、リガンドと請求の範囲 1 に記載のG 蛋白質共役型レセプター蛋白質又はその塩との結合性を変化させる化合物又はその塩は、請求の範囲 1.7 に記載のスクリーニング方法又は請求の範囲 1.8 に記載のスクリーニング用キットを用いることによって特定されており、当該スクリーニング方法及びスクリーニング用キットによって得られるあらゆる化合物を包含するものである。

しかしながら、明細書には、当該スクリーニング方法及びスクリーニング用キットで得られる化合物としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲19は明細書による裏付けを欠いており、開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であって、前記請求の範囲の記載は著し了不明確である。

したがって、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

請求の範囲20,28-32,36-38についても同様である。